

**Heterotrimere G-Proteine in *Nicotiana tabacum* L.:
Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation, Funktion
und zu den biochemischen Eigenschaften der
 β -Untereinheit**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

vorgelegt von
Tatjana Peškan
aus Varaždin, Kroatien

Oktober, 2000

Inhaltverzeichnis

Abkürzungen.....	iii
A. EINLEITUNG	1
1. DER G-PROTEIN KREISLAUF	1
2. DIE α -UNTEREINHEIT	3
3. DER $\beta\gamma$ -KOMPLEX.....	4
4. DIE MODIFIKATION DER HETEROTRIMEREN G-PROTEINE DURCH LIPIDE	5
5. DIE PLASMAMEMBRAN-MIKRODOMÄNEN	6
6. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	7
B. MATERIAL UND METHODEN.....	9
1. MATERIAL	9
1.1. Chemikalien.....	9
1.2. Enzyme.....	9
1.3. Molekulargewichtstandards	10
1.4. Antikörper.....	10
1.5. Oligonukleotide	10
1.6. Bakterien und Plasmide.....	11
1.7. Pflanzenmaterial.....	11
1.8. Allgemeine Puffer	11
2. METHODEN	12
2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	12
2.2. Analyse von DNA.....	12
2.2.1. Isolierung genomischer DNA	12
2.2.2. Radioaktive Markierung von DNA nach Feinberg und Vogelstein (1983).....	13
2.3. Analyse von Proteinen	13
2.3.1. Proteinbestimmung.....	13
2.3.2. Protein-Gelelektrophorese	13
2.3.3. Konstruktion und Überexpression von GST-Fusionsproteinen in E. coli	14
2.3.4. Präparation von polyklonalen anti-G β Antikörpern	15
2.3.5. Reinigung von polyklonalen anti-G β Antikörpern	15
2.3.6. In vitro-Transkription/Translation	16
2.3.7. Immunpräzipitation	16
2.3.8. Western-Analyse	16
2.3.9. Gelfiltrations-Chromatographie.....	17
2.3.10. Nachweis von Glycosylphosphatidylinosit (GPI)-verankerten Proteinen.....	18
2.4. Zellbiologische Methoden.....	18
2.4.1. Isolierung von Mikrosomen.....	18
2.4.2. Auftrennung von Mikrosomen durch Saccharosegradienten	19
2.4.3. Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	19
2.4.4. Extraktion von Polypeptiden aus Mikrosomen.....	19
2.4.5. Isolierung von Plasmamembranen.....	20
2.4.6. Isolierung von Chloroplasten, Mitochondrien und Zellkernen	20
2.4.7. Isolierung von Triton X-100-unlöslichen Membranen	21
2.5. Elektronenmikroskopische Methoden	21
2.5.1. Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie	21
2.5.2. Immun-Elektronenmikroskopie	21
2.6. Herstellung und Analyse von transgenem Pflanzenmaterial	22
2.6.1. Klonierung des „antisense“ G β Konstruktes und die Transformation von N. tabacum	22
2.6.2. Chlorophyllbestimmung nach Schopfer (1989).....	23
2.6.3. Chlorophyll-Fluoreszenzinduktionsanalysen an intakten Keimlingen.....	23

C. ERGEBNISSE	25
1. MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER α - UND β -UNTEREINHEITEN HETEROTRIMERER G-PROTEINE AUS TABAK	25
1.1. <i>Vergleichende Sequenz-Analyse der α- und β-Untereinheiten aus N. tabacum</i>	25
1.1.1. α -Untereinheit	25
1.1.2. β -Untereinheit	27
1.2. Analyse der Kopienzahl von G β im Genom von N. tabacum	29
2. DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER β -UNTEREINHEIT (G β) IN TABAKBLÄTTERN	31
2.1. <i>Die Charakterisierung der Anti-Gβ Antikörper</i>	31
2.2. <i>Gβ läßt sich in der Membranfraktion und im Zellkern, aber nicht in Mitochondrien und Chloroplasten nachweisen</i>	31
2.3. <i>Trennung von Membranen aus Tabakblättern über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten</i>	34
2.4. <i>Gβ ist in der Plasmamembran-Fraktion von Tabakblättern angereichert</i>	34
3. REGULATION DER MENGE DES MEMBRANGEBUNDENEN G β -PROTEINS	37
3.1. <i>Die Menge an Gβ ist vom Entwicklungsstadium der Blätter abhängig</i>	37
3.2. <i>Licht und Phytohormone zeigen keine Wirkung auf die Menge an membrangebundenem Gβ</i>	37
4. BIOCHEMISCHE ANALYSE DER β -UNTEREINHEIT IN MEMBRANFRAKTIONEN	39
4.1. <i>Gβ ist durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran assoziiert</i>	39
4.2. <i>Gβ existiert in der Plasmamembran als Komponente eines 630 kDa großen Komplexes</i>	39
4.2.1. Trennung der Proteinkomplexe mit Hilfe der Blue-native-PAGE	39
4.2.2. Trennung der Proteinkomplexe durch Gelfiltrations-Chromatographie	41
4.3. <i>Identifizierung und Charakterisierung von Triton X-100 unlöslichen Plasmamembran-Subfraktionen in höheren Pflanzen</i>	44
4.3.1. Isolierung Triton X-100-unlöslicher Vesikel aus Plasmamembranen von Tabak	44
4.3.4. G β befindet sich in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion	47
4.3.2. Protein-Analyse der Triton X-100-unlöslichen Membrandomänen	48
4.3.3. Identifizierung GPI- verankerter Proteine in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion	49
5. FUNKTIONELLE ANALYSE VON G β	51
5.1. <i>Phänotyp der Gβ-, antisense“ Pflanzen und Nachweis der Transgenität</i>	51
5.2. <i>Nachweis von Gβ in transgenem Tabak durch Antikörper</i>	53
5.3. <i>Chlorophyllgehalt und Chlorophyll-Fluoreszenz während der Ergrünung</i>	55
D. DISKUSSION	58
1. DIE UNTEREINHEITEN DER HETEROTRIMEREN G-PROTEINE IN HÖHEREN PFLANZEN	58
2. SUBZELLULÄRE LOKALISATION UND MÖGLICHE FUNKTION DES G β	59
3. BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER HETEROTRIMEREN G-PROTEINE HÖHERER PFLANZEN	63
3.1. <i>Assoziation des Gβ-Proteins mit der Plasmamembran</i>	63
3.2. <i>Die native Form des Gβ-Proteins in der Plasmamembran</i>	64
3.3. <i>Triton X-100-unlösliche Mikrodomäne in der Plasmamembran höherer Pflanzen</i>	65
E. ZUSAMMENFASSUNG	69
F. LITERATUR	71
Publikationsliste	82
Danksagung	83
Lebenslauf	84

Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Enzyme

„CAAX“	Cystein-Alanin-Alanin-beliebige Aminosäure
2D	zweite Dimension
ADP	Adenosin-diphosphat
Bistris	Bis-(2-hydroxyethyl)-immino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	Rinderserumalbumin
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',-tetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GDP	Guanosin-diphosphat
Gly	Glycin
GPI	Glycosylphosphatidylinosit
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-triphosphat
IDP	Inosin-diphosphat
IP	Inositphosphat
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI-PLC	Phosphatidylinosit-spezifische Phospholipase C
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-Glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Nukleinsäuren

cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
NTP	Nukleotid-triphosphat

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
°K	Grad Kelvin
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
Bp	Basenpaare
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
M	Mol

mA	Milliampere
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
ms	Millisekunde
ng	Nanogramm
nm	Nanomol
s	Sekunde
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

Proteine und Proteinkomplexe

G β	β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine
G α	α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine
G γ	γ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine
Gt α	α -Untereinheit des Transducins
Gt β	β -Untereinheit des Transducins
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II

Organismen

<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

A. EINLEITUNG

Jede Zelle eines vielzelligen Organismus ist während der Entwicklung darauf programmiert, auf verschiedene Signale der Umgebung zu reagieren. Einige dieser ankommenden Signale gelangen direkt in das Zellinnere, andere werden dagegen an der Plasmamembran von Rezeptoren abgefangen. Die Rezeptoren aktivieren eine Signalkette, die schließlich zelluläre Vorgänge wie Wachstum, Sekretion, Kontraktion oder Stoffwechsel in Gang setzt oder unterdrückt.

Externe Signale wie Licht, Geruch oder bestimmte Hormone und Neurotransmitter werden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weitergeleitet. Diese integralen Membranproteine besitzen sieben Transmembrandomänen und bilden die größte Familie der Membranrezeptoren mit mehr als 200 Mitgliedern (Dohlman *et al.*, 1991). Die Anregung dieser Rezeptoren aktiviert heterotrimere G-Proteine, die wiederum die Aktivitäten von Enzymen oder Ionenkanälen (Effektorproteine) regulieren. Die Effektoren setzen sekundäre Botenstoffe („second messenger“) frei, was schließlich zu einer Reaktion der Zelle auf das Signal führt.

1. Der G-Protein Kreislauf

Die heterotrimeren G-Proteine spielen bei der Signalübertragung vom Zelläußeren ins Zellinnere eine entscheidende Rolle. Sie sind Membranproteine, die sich aus drei Polypeptiden zusammensetzen: einer α -Untereinheit, die GTP bindet und hydrolysiert, einer β -Untereinheit und einer γ -Untereinheit. Die β - und γ -Untereinheit bilden einen stabilen Komplex, der nur unter denaturierenden Bedingungen dissoziieren kann und damit eine funktionelle Einheit darstellt. Die heterotrimeren G-Proteine gehören zu der großen Familie der GTPasen, die durch GTP-Bindung aktiviert werden und in diesem Zustand die Signale übertragen können. Durch die Hydrolyse von GTP gelangt das Protein in eine inaktive Form. Auf diese Weise funktionieren diese Proteine als molekulare „Schalter“, die durch die Bindung von GTP die Signalketten einschalten, und durch die Hydrolyse von GTP wieder inaktivieren.

In Abbildung 1 ist dargestellt, wie das Signal vom Rezeptor zum Effektor übertragen wird (nach Neer, 1995). In der inaktiven Form (GDP-Form) ist die α -Untereinheit mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit assoziiert und das inaktive Trimer bindet an den Rezeptor. Wenn ein chemisches

oder physikalisches Signal den Rezeptor anregt, ändert er seine Konformation, wodurch eine Konformationsänderung der α -Untereinheit ausgelöst wird, die zur Dissoziation von GDP führt. Durch Austausch von GDP gegen GTP, dessen Konzentration in der Zelle höher ist, wird die α -Untereinheit aktiviert (GTP-Form) und dissoziiert vom Rezeptor und $\beta\gamma$ -Komplex. Beide funktionellen Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins, die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheiten, können anschließend Effektoren aktivieren. Nach der Hydrolyse des GTP's durch die interne GTPase Aktivität wird die α -Untereinheit wieder inaktiv und assoziiert mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit und dem Rezeptor.

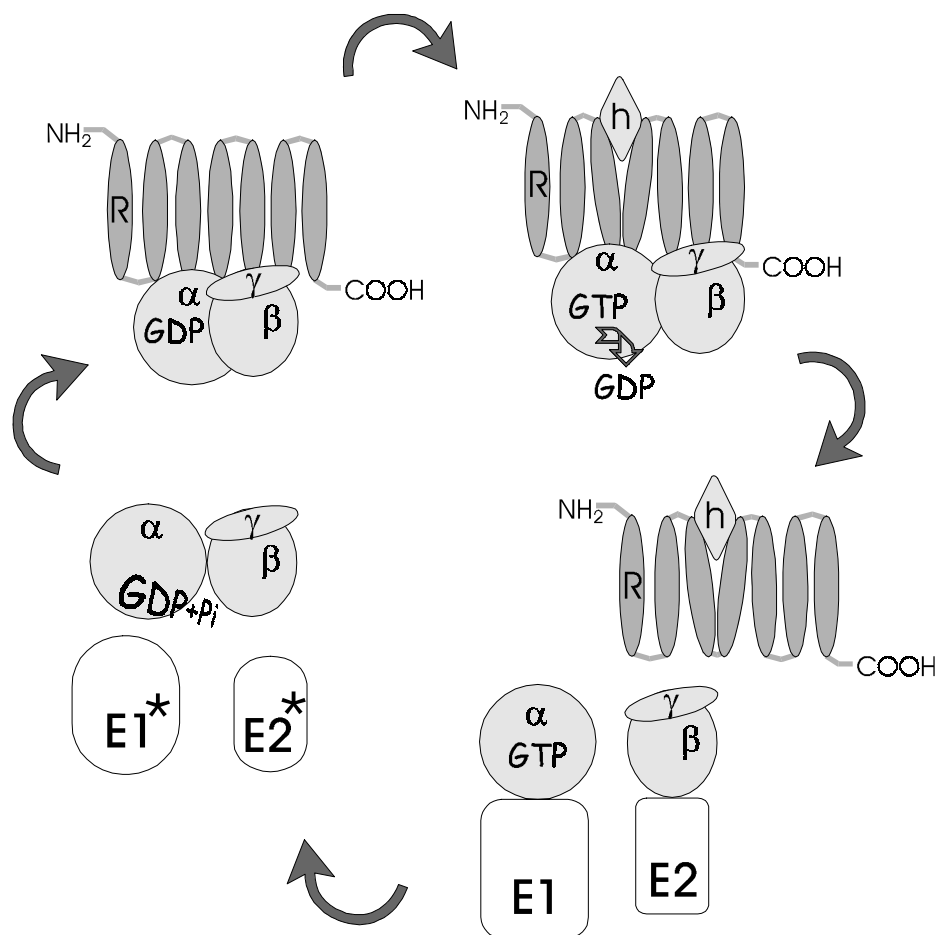


Abbildung 1. Der G-Protein Kreislauf. h, hormon; R, Rezeptor; α, β, γ , die Untereinheiten eines heterotrimeren G-Proteins; E1, E2, Effektorproteine.

2. Die α -Untereinheit

Bei Säugetieren sind 16 Gene für die α -Untereinheit bekannt, wovon einige Transkriptionsprodukte unterschiedlich prozessiert werden („alternative splicing“) und damit in verschiedenen Isoformen vorkommen (Simon *et al.*, 1991). Mehr als 20 verschiedene α -Untereinheiten sind aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit in vier Klassen eingeteilt: G_i , G_s , G_q und G_{12} . Eine Zelle enthält normalerweise mindestens vier oder fünf Typen der α -Untereinheit (Neer, 1994). Einige α -Untereinheiten werden nur in bestimmten Zellen exprimiert, z.B. α_t , α_{gust} oder α_{olf} , die nur in Sinnesorganen vorkommen.

Die Struktur des Transducins ($G_t\alpha$), das bei Wirbeltieren das Sehen reguliert, und des $G_i\alpha_1$, das an der hormonregulierten Inhibition der Adenylatcyclase beteiligt ist, sind inzwischen aufgeklärt (Noel *et al.*, 1993; Coleman, *et al.*, 1994; Lambright *et al.*, 1996). Die α -Untereinheit besteht aus drei Strukturkomponenten: einer Ras-ähnlichen GTPase Domäne, einer α -Helix Domäne mit mehreren α -Helices und einer N-terminalen Helix. Die GTPase Domäne enthält die Bindestelle für GTP sowie die Bindestellen für den Rezeptor, für die $\beta\gamma$ -Untereinheit und für die spezifischen Effektoren. Die Funktion der α -Helix Domäne ist noch unbekannt. Die Strukturen der GTP- bzw. der GDP-gebundenen Form von $G_t\alpha$ sind sich sehr ähnlich, die auffallenden Unterschiede bestehen in der sogenannten „switch“-Region der GTPase Domäne und in der N-terminalen Helix, an der die Wechselwirkungen mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit stattfinden.

Die Binderegion für Effektoren schließt bei α_s die α_2 -Helix ein und überlappt teilweise mit der Bindestelle für $\beta\gamma$, was bedeutet, daß eine gleichzeitige Wechselwirkung mit dem Effektor und dem $\beta\gamma$ -Komplex unwahrscheinlich ist (Neer, 1995).

Die Funktion der α -Untereinheiten kann durch bakterielle Toxine beeinflusst werden (Moss und Vaughan, 1988). Das Cholera-Toxin katalysiert die ADP-Ribosylierung eines Arginins in der GTP-Bindestelle. Da anschließend die GTP Hydrolyse nicht mehr möglich ist, bleibt das G-Protein in einem permanent aktiven Zustand. Das Pertussis-Toxin modifiziert auf ähnliche Weise den C-Terminus der α -Untereinheit und verhindert dadurch die Wechselwirkung mit dem Rezeptor. Die α -Untereinheit ist in der GDP-Form gefangen und somit unfähig zur Wechselwirkung mit dem Effektor. Die Sensitivität gegen Cholera- oder Pertussis-Toxin ist bei den verschiedenen α -Untereinheiten unterschiedlich. Einige sind nur gegen eines der

beiden Toxine sensitiv, während mindestens acht Typen der α -Untereinheit mit diesen Toxinen nicht modifiziert werden können (Hepler und Gilman, 1992).

3. Der $\beta\gamma$ -Komplex

Bisher wurden in Säugetieren sechs β - und 12 γ -Untereinheiten identifiziert (Gautam *et al.*, 1998; Balcueva *et al.*, 2000). Vier β -Untereinheiten ($\beta 1$ bis $\beta 4$) zeigen eine hohe Homologie untereinander, während $\beta 5$ größere Unterschiede zu diesen Subtypen aufzeigt und als zwei Isoformen vorkommt, die das Resultat unterschiedlicher RNA-Prozessierung sind. Die γ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine zeigen zueinander eine niedrigere Homologie im Vergleich zur α - und β -Untereinheit, weshalb lange Zeit nur wenige Mitglieder dieser Proteinfamilie bekannt waren.

Es ist nicht jede beliebige Kombination zwischen β - und γ -Untereinheiten möglich (Pronin und Gautam, 1992; Schmidt *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1996). Spring und Neer (1994) zeigten, daß die Spezifität der β/γ -Wechselwirkung in einer 14 Aminosäuren langen Domäne der γ -Untereinheit liegt. Die unterschiedlichen Affinitäten zwischen den verschiedenen β - und γ -Untereinheiten erlaubt nur die Bildung bestimmter Heterotrimere und ermöglicht damit eine effiziente und spezifische Signalübertragung. Die γ -Untereinheit hat dabei einen Einfluß auf die Eigenschaften des $\beta\gamma$ -Komplexes und kann dessen Interaktion mit dem Rezeptor und den Effektoren modulieren (Yasuda *et al.*, 1996; Matsuda *et al.*, 1998).

Die β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteinen bei Säugetieren besteht aus einer N-terminalen α -Helix, gefolgt von einem sich wiederholenden Modul aus sieben ähnlichen β -Faltblattstrukturen, jedes mit vier antiparallelen Proteinketten. Diese Module bilden die „Blätter“ eines sogenannten β -Propellers (Sondek *et al.*, 1996). Die Struktur des β -Propellers spiegelt sich auf Ebene der Proteinsequenz wieder, die sieben Wiederholungen des WD-Motivs enthält. Das Motiv beginnt bei der Wendung zwischen der dritten und vierten Proteinkette einer β -Faltblattstruktur und endet auf der gleichen Stelle bei der nächsten β -Faltblattstruktur. Das WD-Motiv besteht aus einer 23 bis 41 Aminosäuren langen Proteinsequenz, die meistens mit einem Tryptophan-Aspartat Dipeptid (WD) endet. Sie enthält mehrere konservierte Aminosäuren und wurde auch bei mehreren anderen

eukaryontischen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen nachgewiesen (van der Voorn und Ploegh, 1992; Neer *et al.*, 1994).

Die Strukturanalyse des Transducins zeigte, daß die γ -Untereinheit aus zwei α -Helices besteht. Hydrophobe Aminosäuren am N-Terminus der β - und γ -Untereinheit bilden eine „coiled coil“ Struktur aus, während im β -Propeller umfangreiche Wechselwirkungen mit der C-terminalen α -Helix der γ -Untereinheit stattfinden (Sondek *et al.*, 1996).

Lange Zeit dachte man, daß allein die α -Untereinheit die Aktivität der Effektoren reguliert, während der $\beta\gamma$ -Komplex nur eine Rolle als negativer Regulator spielt (Gilman, 1987). Dieser Standpunkt änderte sich, als Logothetis *et al.* (1987) zeigten, daß der $\beta\gamma$ -Komplex die K^+ -Kanäle im Herz aktiviert. Von da an mehrten sich die Evidenzen dafür, daß der $\beta\gamma$ -Komplex verschiedene Effektoren regulieren kann, z.B. die Adenylatcyclase, Phospholipase $C\beta$, Phospholipase A_2 oder die Phosphoinositid-3-Kinase (Birnbaumer, 1992; Gautam *et al.*, 1998). Die $\beta\gamma$ -Untereinheit kann auch über *Ras* den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Weg aktivieren (Crespo *et al.*, 1994).

4. Die Modifikation der heterotrimeren G-Proteine durch Lipide

Die Membranassoziation der heterotrimeren G-Proteine ist notwendig für ihre biologische Funktion, trotzdem enthält keine der drei Untereinheiten eine hydrophobe Domäne. Bei Säugetieren werden die α - und γ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine durch Lipide modifiziert und dadurch in der Membran verankert. Die Lipidmodifikationen haben einen Einfluß auf die Funktion der heterotrimeren G-Proteine und ihre Wechselwirkung mit anderen Proteinen (Wedegaertner *et al.*, 1995; Higgins und Casey, 1996).

Die α -Untereinheiten sind am N-Terminus mit den gesättigten Fettsäuren Myristylsäure (14 C-Atome) und/oder Palmitinsäure (16 C-Atome) modifiziert. Die Modifikation mit Myristylsäure findet während der Translation statt, die Palmitoylierung dagegen posttranslationell. Die Modifikation mit der Palmitinsäure sorgt für eine stärkere Assoziation mit der Membran im Vergleich zur Myristylsäure und spielt eine Rolle bei der Lokalisation der α -Untereinheit in Detergenz-unlöslichen Plasmamembran-Mikrodomänen (Galbiati *et al.*, 1999).

Die Verankerung der β -Untereinheit ist von der starken Interaktion mit der γ -Untereinheit und von der Isoprenylierung der γ -Untereinheit abhängig. Die Isoprenoide Geranylgeranyl (20 C-Atome) oder Farnesyl (15 C-Atome) werden, wahrscheinlich nach der β/γ -Assemblierung, durch eine starke Thioether-Bindung an einen Cysteinrest im C-terminalen „CAAX“-Motiv der γ -Untereinheit angehängt. Danach folgt eine proteolytische Entfernung der letzten drei Aminosäuren am C-Terminus und die Carboxymethylierung des neuen C-Terminus (Pronin und Gautam, 1993; Higgins und Casey, 1994). Die Isoprenylierung ist absolut entscheidend für eine erfolgreiche Wechselwirkung des $\beta\gamma$ -Komplexes mit den α -Untereinheiten, den Rezeptoren und Effektoren (Wedegaertner *et al.*, 1995).

5. Die Plasmamembran-Mikrodomänen

Die G-Protein-gekoppelte Signalübertragung ist in eukaryontischen Zellen hoch organisiert und kann kaum *in vitro* rekonstruiert werden (Neubig, 1994). Es scheint, daß verschiedene Signalketten innerhalb einer Zelle durch die Lokalisation der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der G-Proteine und deren Effektoren in bestimmten Plasmamembrandomänen voneinander getrennt sind, und daß auf diese Weise eine spezifische Signalübertragung erreicht wird (Neubig, 1994; Neer, 1995).

Während der letzten Dekade häuften sich die Evidenzen, die die Existenz funktioneller Mikrodomänen in der Plasmamembran unterstützen. Die Struktur dieser Domänen basiert auf einer dynamischen Assoziation von Sphingolipiden und Cholesterol in Form spezieller Lipid-Mikrodomänen („lipid rafts“), die bestimmte Proteine einschließen, während andere ausgeschlossen werden (Simons und Ikonen, 1997). Sphingolipid/Cholesterol-angereicherte Mikrodomänen lassen sich mit nichtionischen Detergenzien wie Triton X-100 bei 4°C nicht lösen und können als eine spezifisch leichte Fraktion der Plasmamembran isoliert werden.

Lipid-Lipid Wechselwirkungen scheinen für die Ausbildung der „rafts“ entscheidend zu sein. Die Sphingolipide lagern sich durch Wechselwirkungen zwischen ihren Kohlenstoffhydrat-Köpfen und ihren langen, meist gesättigten Lipid-Ketten zusammen, während die planar gebauten Cholesterolmoleküle den Zwischenraum ausfüllen (Simons und Ikonen, 1997; Kurzchalia und Parton, 1999). Eine ähnliche Struktur wurde auch bei artifiziellen Membranen beschrieben (Brown und London, 1997). Die Proteine interagieren mit diesen Strukturen durch

ihre Transmembrandomänen oder durch ihre Lipidanker, z.B. den gesättigten Acylketten oder dem Glycosylphosphatidylinosit (GPI), die auch als Signal für die Lokalisation in Lipid-Mikrodomänen dienen (Lisanti und Rodrigues-Boulau, 1990).

Caveolen sind Vertiefungen der Plasmamembran, die eine spezielle Form der „rafts“ repräsentieren. Sie sind in spezifischen Zellprozessen involviert, wie z.B. der Potozytose, Proteinsortierung oder Signalübertragung. Die Gestaltung dieser Strukturen scheint zusätzlich von dem integralen Membranprotein Caveolin abhängig zu sein, das Sphingolipide und Cholesterol binden kann (Parton und Simons, 1995). Komponenten verschiedener Signalketten, einschließlich der G-Protein-gekoppelten Signalübertragung, der Kalzium-Signalkette und des Mitogen-aktivierten Proteinkinasesignalwegs, sind in diesen Domänen angereichert (Anderson, 1998; Schlegel *et al.*, 1998). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden beispielsweise nach ihrer Aktivierung in die Caveolen transloziert (Raposo *et al.*, 1987). Andererseits zeigten Li *et al.* (1995), daß ausschließlich inaktives $G_s\alpha$ mit dem Caveolin interagiert. Caveoline können die GTPase Aktivität der gereinigten heterotrimeren G-Proteine regulieren, was darauf hinweist, daß Caveolen eine wichtige Rolle in diesem Signalweg spielen.

6. Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung der Keimlinge im Licht (Photomorphogenese) und im Dunkeln (Skotomorphogenese) unterscheidet sich dramatisch voneinander, was darauf hindeutet, daß das Licht eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung höherer Pflanzen spielt. Licht induziert während der Keimlingsentwicklung die Differenzierung der Kotyledonen und Blätter, verhindert die Verlängerung des Hypokotyls und ermöglicht die Entwicklung funktioneller Chloroplasten (von Arnim und Deng, 1996).

Die Expression der kernkodierten Komponenten des Photosyntheseapparates ist außer durch Licht auch durch Cytokinine und die Anwesenheit funktioneller Chloroplasten (Plastidensignal) reguliert (Oelmüller, 1989; Susek *et al.*, 1993). Auf der Suche nach weiteren Komponenten dieser Signalkette stellte man fest, daß z.B. Ca^{2+} , GTP, Cholera-Toxin bzw. Aktivatoren des IP-Kreislaufs die Expression lichtregulierter Gene im Dunkeln stimulieren (Neuhaus *et al.*, 1993; Romero und Lam, 1993; Sopory *et al.*, 1999). Dies deutet darauf hin, daß heterotrimere G-Proteine bei der Regulation dieser Signalkette beteiligt sind.

Über heterotrimere G-Proteine höherer Pflanzen ist noch immer wenig bekannt. Der Vergleich der Proteinsequenzen der bisher identifizierten α - und β -Untereinheiten zeigt, daß sie früh im Lauf der Evolution von den Untereinheiten anderer Eukaryonten divergierten und zu einer neuen Familie der heterotrimeren G-Proteine (G_p) gehören (Weiss *et al.*, 1994; Gotor *et al.*, 1996). Die Zahl der Untereinheiten scheint bei Pflanzen niedriger zu sein als bei Säugetieren. Nur zwei Typen der α -Untereinheiten und ein Typ der β -Untereinheit sind bisher aus höheren Pflanzen bekannt, während eine γ -Untereinheit noch nicht identifiziert wurde (Bischoff *et al.*, 1999).

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, daß die heterotrimeren G-Proteine bei höheren Pflanzen verschiedene Signalwege regulieren können. Neben der durch Licht und Hormone regulierten Genexpression (Kaufman, 1993; Yang, 1996; Hooley, 1998) wurde eine Beteiligung bei der Regulation von K^+ -Kanälen in Geleitzellen und beim Öffnen der Stomata (Fairley-Gremont und Assmann, 1991; Li und Assmann, 1993;) sowie bei der Interaktion zwischen Pflanzen und Symbionten (Pingret *et al.*, 1998) bzw. Krankheitserregern (Beffa *et al.*, 1995; Gelli *et al.*, 1997) postuliert. Dies sind jedoch nur indirekte Beweise, die sich auf die Anwendung von Aktivatoren (GTP-Analoga, Cholera-Toxin, Mastoparan) bzw. Inhibitoren (GDP-Analoga, Pertussis-Toxin) heterotrimerer G-Proteine stützen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion und den biochemischen Eigenschaften des putativen $\beta\gamma$ -Komplexes in höheren Pflanzen. Die Rolle der heterotrimeren G-Proteine in der lichtabhängigen Genexpression wurde mit Hilfe transgener Pflanzen untersucht, bei denen die Expression der β -Untereinheit reduziert ist. Weiterhin wurden die Lokalisation der β -Untereinheit in Blattzellen und die Eigenschaften des nativen Proteins analysiert.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIAL

1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien in p.a. Qualität wurden von folgenden Firmen bezogen: Biomol Feinchemikalien, Hamburg; Difco Laboratories Detroit, USA; ICN Biomedicals, Meckenheim; Merck Eurolab, Darmstadt; Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe; Serva Feinbiochemika, Heidelberg; Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen.

Material für Chromatographie (CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Protein A Sepharose CL-4B, Glutathion-Sepharose 4B, HiPrep 16/60 Sephacryl S-300-Säule) und Radiochemikalien wurden von Amersham-Pharmacia-Biotech (Freiburg) bezogen.

Triton X-100, Triton X-114, Leupeptin, Pepstatin A, and Antipain wurden von Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

1.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Amersham-Pharmacia-Biotech (Freiburg)
DNA Polymerase I, Klenow Fragment	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Phosphatidylinosit-spezifische Phospholipase C (PI-PLC aus <i>Bacillus cereus</i>)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
Sequenase Ver. 2.0	U.S. Biochemicals Corp. (Cleveland, USA)
T3 RNA Polymerase	Boehringer Mannheim (Mannheim)
T4 DNA Ligase	Boehringer Mannheim (Mannheim)

Restriktionsendonukleasen wurden bei Boehringer Mannheim (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach / Taunus) erworben.

1.3. Molekulargewichtstandards

Für DNA wurde als Größenstandard „1 kb ladder“ von Gibco BRL (Eggenstein) verwendet. Proteinmolekulargewichtstandarde „Low molecular weight calibration kit“ und „Gel filtration calibration kit“ wurden von Amersham-Pharmacia-Biotech (Freiburg) bezogen.

1.4. Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet:

- Anti-33 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates (von Prof. Dr. R.B. Klösgen, Martin-Luther-Universität Halle),
- Anti-mitochondriale Serine-Hydroxymethyltransferase (SHMT; von Prof. E. Glaser, Department of Biochemistry, Stockholm University),
- Anti-UBP1 (von Dr. W. Filipowicz, Friedrich Miescher Institut, Basel),
- Antikörper-Konjugate mit Meerrettich-Peroxidase („Goat anti-rabbit IgG“) von Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) und „Goat anti-rabbit IgG“ für Elektronenmikroskopie von British Biocell International (Cardiff, UK).

1.5. Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Sequenzierung (T3, T7, M13 „reverse“, M13 „forward“) wurden von Promega (Mannheim), genspezifische Oligonukleotide von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

Zur Konstruktion von Expressionsplasmiden

G-β5' 5'-GAA TTC CCG GGA TGT CAG TGA CAG AGC TGA AAG AGC-3'
G-β3' 5'-GAA TTC CAC TTC TGT CCC TCC AAA AGC CC-3'

Zur Sequenzierung und Analyse der „antisense“-Pflanzen

G-βf 5'-ATG TCA GTG ACA GAG CTG AAA G-3'
G-β5'1 5'-CCT GTC AAT ATG TTC CAG-3'
G-β5'3 5'-CAC TGG ATT GGA CTC CAG-3'
G-β3'1 5'-GGT GTC CAG TCC TAA TGT C-3'
G-β3'3 5'-CTC CTC CCA AGT TTA GGA CC-3'
β-G 5'-CCA GTG TGT CCT TGC AGG-3'

1.6. Bakterien und Plasmide

Bakterien

<i>E. coli</i> DH5 α	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> BL21	Studier und Moffat, 1986

Plasmide

pBluescript II KS+	Stratagene (Heidelberg)
pCR 2.1	Invitrogen BV (Leck, Niederlande)
pGex-2T	Amersham-Pharmacia-Biotech (Freiburg)

1.7. Pflanzenmaterial

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* Samsun NN) wurden im Gewächshaus angezogen. Die Blätter wurden nach 4 – 5 Wochen geerntet.

1.8. Allgemeine Puffer

TE Puffer:	10,0 mM 1,0 mM	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA
10 x TBE:	1,0 M 0,5 mM 20,0 mM	Tris Borsäure EDTA
50 x TAE:	2,0 M 1,0 M 20,0 mM pH 7,4 – 7,6	Tris Natriumacetat EDTA
PBS Puffer:	75,0 mM 3,0 mM 1,5 mM 4,5 mM	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ , pH 7,5
TBS Puffer:	10,0 mM 150,0 mM	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl

2. METHODEN

2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Nachfolgend aufgeführte Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet und nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt:

- Steriles Arbeiten,
- DNA-Restriktion,
- DNA-Modifikation mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase und dem Klenow-Enzym,
- Agarosegelelektrophorese,
- Ligation,
- Transformation von *E. coli*,
- Anlegen von Stammkulturen,
- Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979),
- Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977),
- *Southern*-Hybridisierung,
- Coomassie Blau Färbung.

Für die Agarosegelelektrophorese wurde 1 x TAE und für die DNA-Sequenzierung 1 x TBE Puffer verwendet. Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „Jetsorb Kit“ von Genomed verwendet. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde nach dem Laborprotokoll (Bolle, 1995; Landsberger, 1999) durchgeführt.

2.2. Analyse von DNA

2.2.1. Isolierung genomischer DNA

Extraktionsmedium:	2,0 % (w/v)	CTAB
	100,0 mM	Tris-HCl, pH 8
	20,0 mM	EDTA
	1,4 M	NaCl
	2,0 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon 40

3 g Pflanzenmaterial wurden im flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in 10 ml Extraktionsmedium mit 20 µl 2-Mercaptoethanol für 15 Min. gelöst. Danach erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 65°C und eine 20-minütige Zentrifugation bei 4.000 x g (Raumtemperatur). Der Überstand wurde einmal mit Chloroform / Isoamylalkohol (24:1)

extrahiert. Die Wäßrige Phase wurde mit 2/3 Vol. eiskaltem 2-Propanol gemischt, 16 h bei 4°C inkubiert und bei 10.000 \times g (4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 2 ml TE-Puffer gelöst und die Probe mit 1 μ l RNase Lösung (10 mg / ml) für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit 20 μ l 3 M Natriumacetat und 5 ml Ethanol ausgefällt, sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 500 μ l TE-Puffer gelöst.

2.2.2. Radioaktive Markierung von DNA nach Feinberg und Vogelstein (1983)

10 ng DNA wurden nach der Denaturierung mit je 10 mM dATP, dGTP, und dTTP, 0,125 A₂₆₀-Einheiten Hexanukleotidmix (Boehringer Mannheim, Mannheim), 30 μ Ci [α -³²P]dCTP, 1 U Klenow-Enzym in 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithioerythrit für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung nicht inkorporierter Nukleotide erfolgte durch Gelfiltration über eine Sephadex G-50-Säule (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg).

2.3. Analyse von Proteinen

2.3.1. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach Bradford (1976) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Membranfraktionen wurden vor der Proteinbestimmung mit 0,5% (w/v) Triton X-100 solubilisiert.

2.3.2. Protein-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sofern nicht anders angegeben, wurden Proteine im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970) aufgetrennt.

Blue-native Gelelektrophorese und 2D Elektrophorese

Membran-Proteinkomplexe von Plasmamembranen wurden auf *Blue-native*-Gelen (Schägger und Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994) aufgetrennt. Dazu wurden die Membranen mit 1% (w/v) n-Octylglucosid und 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure in TED-Puffer (siehe 2.3.9.) 1 h bei 4°C inkubiert. Nicht solubilisierte Membranen wurden 1 h bei 100.000 \times g sedimentiert. Zum

Überstand wurden Coomassie G-250 (Endkonzentration 0,3% w/v) und Glycerin (Endkonzentration 10% v/v) zugegeben. Danach wurde die Probe auf das Gel aufgetragen.

Kathodenpuffer:	50,0 mM	Tricin
	15,0 mM	Bis-Tris
	0,005 % (w/v)	Coomassie G-250
	pH 7,0 (4°C)	
Anodenpuffer:	50,0 mM	Bis-Tris-HCl, pH 7,0 (4°C)
Gelpuffer:	1,5 M	ϵ -Aminocapronsäure
	0,15 M	Bis-Tris-HCl, pH 7,0 (4°C)
Gel-Mischung:	0,48 g/ml	Acrylamid
	0,015 g/ml	Bisacrylamid

Die Elektrophorese wurde bei 100 V über Nacht (mindestens 15 h) bei 4°C durchgeführt. Für die zweite Dimension wurde die gewünschte Spur aus dem *Blue-native*-Gel ausgeschnitten und nach Schägger und Jagow (1991) für die SDS-PAGE vorbereitet.

2.3.3. Konstruktion und Überexpression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Für die Überexpression von GST-G β -Fusionsprotein wurde die G β -cDNA (Kusnetsov und Oelmüller, 1996) im richtigen Leserahmen in das Plasmid pGex-2T ligiert. Dazu wurden am 5'-Beginn und am 3'-Ende der cDNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Oligonukleotiden G- β 5' und G- β 3' *Eco*RI-Schnittstellen generiert. Das PCR-Produkt wurde in das Plasmid pCR 2.1 ligiert. Durch Restriktion mit *Eco*RI konnte die G β -cDNA isoliert, über Agarosegelelektrophorese gereinigt und in die *Eco*RI-Schnittstelle des Plasmides pGex-2T ligiert werden (pGST-G β). Die Korrektheit des Leserahmens und der G β -Sequenz wurde durch Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) überprüft.

Das Konstrukt pGST-G β (1-54) enthält nur die Sequenz für die ersten 54 Aminosäuren von G β und wurde für die Reinigung der Antikörper konstruiert. Dazu wurde das Plasmid pGST-G β mit *Bgl*II geschnitten, mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dann mit *Pst*I geschnitten, um ein Fragment zu bekommen, das die Sequenz für GST und die ersten 54 Aminosäuren von G β enthält. Dieses Fragment wurde anschließend mit einem *Sma*I / *Pst*I Fragment des Plasmides pGex-2T ligiert.

Die Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21 nach dem Protokoll von Amersham-Pharmacia-Biotech (Freiburg) überexprimiert und gereinigt.

2.3.4. Präparation von polyklonalen anti-G β Antikörpern

Zur Immunisierung von Kaninchen („New Zealand White Rabbits“) wurden 120 μ g Fusionsprotein GST-G β in 200 μ l Immunstimulans (Titermax) zugegeben. Die gut gemischte Emulsion wurde dem Kaninchen subkutan nahe den Achsellymphknoten injiziert. Die zweite Immunisierung erfolgte vier Wochen nach der ersten Injektion mit 600 μ g Fusionsprotein. Acht Tage nach der Folgeinjektion wurde aus der Ohrvene Blut entnommen und zur Gerinnung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Partikuläre Verunreinigungen des Serums wurden 20 Min. bei 12.000 \times g sedimentiert und das Komplementsystem durch eine 30-minütige Inkubation bei 56°C inaktiviert. Aliquotierte Portionen wurden bei –20°C gelagert.

2.3.5. Reinigung von polyklonalen anti-G β Antikörpern

W-Puffer:	0,01 M	Tris-HCl, pH 8
	0,14 M	NaCl
	0,025 % (w/v)	NaN ₃
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
NaPi-Puffer:	0,05 M	NaPi, pH 6,3
	0,5 M	NaCl
	0,1 % (v/v)	Triton X-100
Gly-Puffer:	0,05 M	Gly-HCl, pH 2,5
	0,15 M	NaCl
	0,1 % (v/v)	Triton X-100

Die IgG Fraktion wurde mit Hilfe der Protein A Sepharose CL-4B nach Angaben des Herstellers gewonnen und weiter durch eine Affinitätschromatographie auf G β (1-54)-Sepharose gereinigt.

Zur Herstellung der Affinitätssäule wurde das Fusionsprotein GST-G β (1-54) 17 h mit Thrombinprotease (10 U/mg Protein) behandelt und mittels einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau wurde das Polypeptid G β (1-54) (ca. 5 kDa) aus dem Gel eluiert und nach dem Protokoll von Amersham-Pharmacia-Biotech (Freiburg) an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt.

Für die Affinitätschromatographie wurden 2 ml G β (1-54)-Sepharose mit 6 ml anti-G β IgG Fraktion in W-Puffer für 1 h inkubiert und zweimal mit W-Puffer (10 ml) und einmal mit NaPi-Puffer (8 ml) gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper mit 10 ml Gly-Puffer eluiert und in 10 Fraktionen von je 1 ml aufgefangen. Die Fraktionen wurden sofort mit 0,1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 9) neutralisiert.

2.3.6. *In vitro*-Transkription/Translation

Für die *in vitro*-Transkription wurden 20 μ g Plasmid-DNA mit der geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert und über Ethanol-fällung gereinigt. Die *in vitro*-Transkription erfolgte nach dem Protokoll von Boehringer Mannheim (Mannheim) mit dem „*In vitro* Transkriptionssystem“ und der T3 RNA Polymerase. Die Translation erfolgte mit dem „Rabbit reticulocyte lysate system“ (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) und 35 S-Methionin nach Angaben des Herstellers.

2.3.7. Immunpräzipitation

IP-Puffer:	140 mM	NaCl
	1 % (v/v)	Triton X-100
	10 mM	Tris-HCl, pH7,5
	1 mM	EDTA

Präimmunsereum bzw. anti-G β -Serum wurden 1:50 im IP-Puffer verdünnt und mit radioaktiv markiertem Protein bei 4°C inkubiert. Nach 16 h wurde Protein A Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) dazugegeben. Die Mischung wurde für weitere 2 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend bei 20.000 \times g für 20 s zentrifugiert. Die Sedimente wurden viermal im IP-Puffer gewaschen. Die Proteine im Überstand wurden mit Aceton gefällt und wie die Sedimente in 2 \times SDS-Auftragspuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen.

2.3.8. Western-Analyse

Transferpuffer.	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris-HCl
	10 % (v/v)	Methanol

B-PBS-T:	1 x	PBS
	5 % (w/v)	Magermilch
	1 % (v/v)	Tween 80

PBS-T:	1 x	PBS
	0,1 % (v/v)	Tween 80

Die Übertragung der Proteine von Polyacrylamidgelen auf Hybond-P Membranen (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) erfolgte in einer "Semi-dry" Transferapparatur (OWL Separation Systems) für 1 h bei 400 mA. Die Membranen wurden nach der Proteinübertragung zuerst für 1 h im B-PBS-T und anschließend für 2 h mit Anti-G β (Verdünnung 1:100), Anti-33kD OEC, Anti-SHMT oder Anti-UBP1 Antikörper (in B-PBS-T) inkubiert. Nach dem Waschen mit B-PBS-T wurden die Membranen für eine weitere Stunde mit dem Meerrettich-Peroxidase Antikörper-Konjugat in B-PBS-T inkubiert und anschließend mit PBS-T gewaschen. Die Chemolumineszenz-Reaktion erfolgte nach Adamska *et al.* (1993).

2.3.9. Gelfiltrations-Chromatographie

TED-Puffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	3 mM	EDTA
	1 mM	DTT

Elutionspuffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	0,8 % (w/v)	Cholat

Zur Vorbereitung der Proteine für die Gelfiltration wurden Mikrosomen mit 1% (v/v) Cholat in TED-Puffer für 1 h auf Eis inkubiert und danach bei 100.000 \times g und 4°C für 2 h zentrifugiert (Rotor SW40, Beckman, Palo Alto, USA). Der Überstand (4,5 mg Protein, 2 ml) wurde auf eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-300-Säule aufgetragen, bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,33 ml/min eluiert und in 64 Fraktionen von je 2 ml aufgefangen. Die Molekulargewichtsmarker wurden unter den gleichen Bedingungen in folgender Reihenfolge aufgetrennt:

Lauf 1. Aldolase (17,6 mg)	Lauf 2. Albumin (10 mg)
Ferritin (5 mg)	Catalase (16 mg)

2.3.10. Nachweis von Glycosylphosphatidylinosit (GPI)-verankerten Proteinen

Die Biotinylierung von Plasmamembranen und der Nachweis von biotinylierten Proteinen mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP) erfolgte mit dem „Biotinylation module“ (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmamembranen wurden zuerst mit dem Biotinylierungspuffer (Bicarbonatpuffer aus „Biotinylation module“ mit 330 mM Saccharose) gewaschen und bei $100.000 \times g$ und 4°C für 1 h zentrifugiert (Rotor 70 Ti, Beckman, Palo Alto, USA). Danach wurden die Membranen vorsichtig im Biotinylierungspuffer resuspendiert und mit dem Biotinylierungsreagenz auf Eis für 30 Min. inkubiert. Nach der Biotinylierung wurden die Membranen einmal mit dem Biotinylierungspuffer und einmal mit TBS wie zuvor gewaschen und dann mit Triton X-100 bei 4°C solubilisiert. Die Triton X-100-unlösliche Fraktion wurde aus dem Saccharosegradienten entnommen, bei $100.000 \times g$ und 4°C für 90 Min. sedimentiert und in 500 μl TBS aufgenommen. Die Triton X-114-Extraktion und die PI-PLC-Behandlung erfolgten nach Lisanti (1995). Die Proteine der wäßrigen Phasen wurden nach Bensadoun und Weinstein (1972) quantitativ gefällt, in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Hybond-P Membran übertragen.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Isolierung von Mikrosomen

Homogenisationspuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	330 mM	Saccharose
	3 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	5 % (w/v)	Polyvinylpolypyrrolidon

Der Aufschluß der Tabakblätter mit vorgekühltem Homogenisationspuffer und die Zentrifugationen wurden bei 4°C durchgeführt. 100 g Blattmaterial der Tabakpflanzen wurden mit 400 ml Homogenisationspuffer siebenmal für fünf Sekunden im Homogenisator (Waring Blender) aufgeschlossen, durch vier Schichten Gaze filtriert und anschließend im GSA Rotor (Sorvall) für 20 Min. bei 8000 UpM ($10.000 \times g$) zentrifugiert. Der Überstand wurde danach im SS34 Rotor (Sorvall) für 1 h bei 20.500 UpM ($50.000 \times g$) zentrifugiert, um die Mikrosomen zu sedimentieren.

Kotyledonen (ca. 100 g) wurden in 1 ml vorgekühltem Homogenisationspuffer (ohne Polyvinylpolypyrrolidon) durch Mörsern aufgeschlossen. Das Homogenat wurde erst bei

10.000 \times g für 10 Min. (4°C) zentrifugiert. Die Mikrosomen wurden aus dem Überstand durch Zentrifugation (1 h, 50.000 \times g, 4°C) sedimentiert.

Kotyledonen von *Lupinus luteus* wurden vor der Präparation der Mikrosomen mit den Phytohormonen Benzylaminopurin bzw. Abscisinsäure behandelt (Kusnetsov *et al.*, 1994).

2.4.2. Auftrennung von Mikrosomen durch Saccharosegradienten

Gradientenpuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	330 mM	Saccharose
	1 mM	DTT
	1 mM	MgCl ₂ oder 10 mM EDTA

Die Mikrosomen wurden im Gradientenpuffer resuspendiert und auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (15 - 50% w/w) aufgetragen. Nach einer 14-stündigen Zentrifugation in einem SW 28 Rotor (Beckman, Palo Alto, USA) bei 100.000 \times g und 4°C wurden die Gradienten von oben nach unten in 1 ml Aliquots fraktioniert. Diese Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu weiteren Analysen bei -80°C aufbewahrt.

2.4.3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Membranfraktionen aus Saccharosegradienten wurden nach Briskin *et al.* (1987) aufgrund folgender Enzymaktivitäten charakterisiert: der Kalium-stimulierten Vandat-sensitiven ATPase für die Plasmamembran, der Nitrat-sensitiven ATPase für den Tonoplasten, der Cyanid-insensitiven NADH⁺-abhängige Cytochrom-c-Reductase (E.C. 1.6.993) für das endoplasmatische Reticulum (ER) und der latenten IDPase für den Golgi-Apparat.

2.4.4. Extraktion von Polypeptiden aus Mikrosomen

Mikrosomen entsprechend 10 mg/ml Protein wurden in 200 μ l 0,5 M NaCl, 1 M NaCl, 3 M Harnstoff, 1% (w/v) Na-Cholat oder 100 mM Na₂CO₃ (jeweils in Homogenisationspuffer) resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Membranen wurden bei 100.000 \times g und 4°C für 60 Min. zentrifugiert und in 2 \times SDS-Auftragspuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen. Die Proteine im Überstand wurden mit dem SDS-Auftragspuffer verdünnt und wie die Membranen bei 80°C für 10 Min. denaturiert.

2.4.5. Isolierung von Plasmamembranen

Zwei-Phasen-Puffer:	330 mM	Saccharose
	3 mM	KCl
	5 mM	K-Phosphat; pH 7,8

Die Isolierung von Plasmamembranen aus Mikrosomen erfolgte nach Larsson *et al.* (1987). Die Mikrosomen wurden im Zwei-Phasen-Puffer resuspendiert und auf ein Zwei-Phasen-System aus jeweils 6,2% (w/w) Polyethylenglycol 3350 und Dextran T500 aufgetragen. Nach der Extraktion wurde die obere Phase 1:3 und die untere Phase 1:10 mit Homogenisationspuffer verdünnt und bei 100.000 \times g und 4°C für 40 Min. zentrifugiert. Die Membranen aus der oberen bzw. unteren Phase wurden wieder im Homogenisationspuffer aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und für weiterführende Analysen bei – 80°C aufbewahrt.

2.4.6. Isolierung von Chloroplasten, Mitochondrien und Zellkernen

Chloroplasten wurden nach Bartlett *et al.* (1982) und Mitochondrien nach Håkansson *et al.* (1988) isoliert.

Zellkerne wurden aus Protoplasten isoliert, die nach Koop *et al.* (1996) vorbereitet waren.

Puffer für die Zellkernisolierung (NIB):	10,0 mM	2-[N-morpholino]ethan-sulfonsäure (MES), pH 5.5
	10,0 mM	NaCl
	10,0 mM	KCl
	2,5 mM	EDTA
	2,5 mM	2-Mercaptoethanol
	0,1 mM	Spermidin
	250,0 mM	Mannit
	0,6 % (v/v)	Triton X-100

Die Protoplasten aus 6 Petri-Schalen wurden in 4 ml NIB resuspendiert und auf Eis für 30 Min. inkubiert. Der Aufschluß der Protoplasten erfolgte durch mehrmaliges Aufziehen mit einer intradermalen Nadel (26 „gauge“). Zellkerne wurden durch einen Percollgradienten (4 ml 67% v/v Percoll, 2 ml 43% v/v Percoll in NIB) gereinigt. Die Gradienten wurden bei 1000 \times g für 5 Min. zentrifugiert. Zellkerne wurden aus der 43% / 67% Interphase entnommen, mit 10 ml NIB verdünnt, bei 600 \times g für 5 Min. sedimentiert und in Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 3 mM EDTA) aufgenommen.

2.4.7. Isolierung von Triton X-100-unlöslichen Membranen

TED-Puffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	3 mM	EDTA
	1 mM	DTT

Die Isolierungsprozedur ist in Abbildung 18 zusammengefaßt. Plasmamembranen wurden in TED-Puffer resuspendiert und danach mit 1% (v/v) Triton X-100 für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach der Solubilisierung mit Triton X-100 wurden die Membranen mit einer Saccharose-Lösung gemischt zu einer Endkonzentration von 48% (w/w) Saccharose und mit einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (15 - 45% w/w) überschichtet. Die Gradienten wurden in einem SW 40 Rotor (Beckman, Palo Alto) bei 250.000 \times g und 4°C für 20 h zentrifugiert.

In einigen Fällen wurden die Membranen mit Ultraschall (Sonoplus HD70 mit der Spitze SH70, Bandelin electronic, Berlin; 20 W) anstatt mit Triton X-100 behandelt und anschließend durch den kontinuierlichen Saccharosegradienten gereinigt.

2.5. Elektronenmikroskopische Methoden

2.5.1. Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Die Vesikelsuspensionen wurden zwischen zwei „sandwich“ Kupferträger eingeschlossen und schnell (600 °K/s) in flüssigem Propan eingefroren. Der Gefrierbruch wurde in einem „BAF400T Gefrierbruchapparat“ (BAL-TEC, Liechtenstein) mit einem Doppelreplikatisch durchgeführt. Die Proben wurden ohne Ätzung mit 2 - 2.5 nm Pt/C, im Winkel von 35° und bei -150°C bedampft. Die Replika wurden bei 80°C für 10 Min. in konz. HNO₃ gereinigt. Anschließend wurden die Replika mit destilliertem Wasser gewaschen, auf dem Kupfernetzchen montiert und im EM 902A Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) untersucht. In allen Gefrierbruchabbildungen ist die Bedampfungsrichtung von unten nach oben.

2.5.2. Immun-Elektronenmikroskopie

Reinigungslösung:	10,0 mM	Tris-HCl, pH 8.3
	2,5 % (w/v)	SDS
	30,0 mM	Saccharose

Antikörper-Lösung I:	1 x	PBS (oder 1 x TBS)
	0,5 % (w/v)	BSA
	1:50 verdünnter anti-G β	Antikörper
Antikörper-Lösung II:	1 x	PBS (oder 1 x TBS)
	0,5 % (w/v)	BSA
	1:50 verdünntes „Goat anti-rabbit IgG“	mit 10 nm Gold

Die Replika wurden vor der Immunogoldmarkierung für 16 – 20 h, nach Fujimoto (1995), in der Reinigungslösung inkubiert. Dann wurden die Replika viermal mit PBS gewaschen und für 30 Min. in PBS / 1% (w/v) BSA abgesättigt. Zur Immunogoldmarkierung wurden die Replika in einen Tropfen PBS / 0,1% BSA übertragen und dann in einem Tropfen Antikörper-Lösung I für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen (4 x) mit PBS erfolgte die Inkubation in der Antikörper-Lösung II (1 h). Die Replika wurden danach mehrmals mit PBS gewaschen und mit 0,5% (w/v) Glutaraldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser gespült und auf Formvar (Polyvinylformal)-befilmte Netzchen aufgebracht.

Die Immunogoldmarkierung von negativ gefärbten Vesikeln wurde nach der modifizierten Methode von Wischik (1988) durchgeführt. 20 μ l Membranen wurden auf ein Kohlenstoff-befilmtes Kupfernetzchen (400 Maschen) für 1 – 5 Min. adsorbiert. Die Netzchen wurden in TBS / 0.1% (w/v) Gelatine für 10 Min. abgesättigt und in Antikörper-Lösung I für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS / 0.1% Gelatine, wurden die Netzchen 1 h in Antikörper-Lösung II inkubiert, dann viermal mit TBS / 0.1% Gelatine gewaschen und mit 1% (w/v) Uranylacetat negativ gefärbt.

2.6. Herstellung und Analyse von transgenem Pflanzenmaterial

2.6.1. Klonierung des „antisense“ G β Konstruktes und die Transformation von *N. tabacum*

Zur Expression von G β „antisense“ RNA in *N. tabacum* wurde ein 1000 Bp langes Fragment am 5'-Ende von G β -cDNA (Kusnetsov und Oelmüller, 1996) mit *EcoRV* geschnitten. Danach wurde das Fragment in eine entgegengesetzte Orientierung in einen mit *SacI* und *SmaI* geschnittenen Vector pBin-426Bgl (Troidl, 1995) ligiert.

Der Konjugative Plasmidtransfer von *E. coli* in *A. tumefaciens* erfolgte nach Bevan (1984). Die Transformation von *N. tabacum* mit der „leaf-disc“-Methode wurde nach Horsch *et al.* (1985) durchgeführt.

2.6.2. Chlorophyllbestimmung nach Schopfer (1989)

Extraktionsmedium: 80 % (v/v) Aceton
195 ml destilliertes Wasser
5 ml konz. (25% w/w) NH₃-Lösung

20 mg Pflanzenmaterial wurden in einer Reibschale mit 300 µl Extraktionsmedium fein zerrieben, die Reibschale wurde zweimal mit 300 µl Medium nachgespült. Das Homogenat wurde genau auf 1 ml mit Medium aufgefüllt, 30 Min. auf Eis im Dunkeln inkubiert und danach bei 10.000 \times g für 15 Min. (5°C) zentrifugiert. Der völlig klare Überstand wurde entnommen und für die Messung verwendet. Die Extinktion der Extrakte wurde bei 645 und 663 nm bestimmt. Der Chlorophyllgehalt wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Chlorophyllgehalt [mg/l]} = 20,2 E_{645} + 8,02 E_{663}$$

$$\text{Chlorophyll } a \text{ [mg/l]} = 10,3 E_{663} - 0,18 E_{645}$$

$$\text{Chlorophyll } b \text{ [mg/l]} = 19,7 E_{645} - 3,87 E_{663}$$

2.6.3. Chlorophyll-Fluoreszenzinduktionsanalysen an intakten Keimlingen

Die *in vivo* Chlorophyll *a*-Fluoreszenz wurde bei Raumtemperatur mittels eines Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometers (PAM 101/102/103, Walz, Effeltrich) angeregt und gemessen (Schreiber, 1986). Vor der Messung wurden die 12 Tage alten Keimlinge 7 Min. vorverdunkelt. Die Grundfluoreszenz F_0 wurde durch gepulstes Meßlicht angeregt (Taktfrequenz von 1,6 kHz bei einer Pulsdauer von 1 µs, einer „Peak“-Wellenlänge von 650 nm und mit einer Intensität von 0,1 µmol m⁻² s⁻¹). Durch Auslösen eines sättigenden Weißlichtpulses (6000 µmol m⁻² s⁻¹, bei einer Dauer von 600 ms) unter automatischer Frequenzerhöhung auf 100 kHz wurde die maximale Fluoreszenz (F_m), und das Verhältnis $(F_m - F_0) / F_m = F_v$ (variable Fluoreszenz) / F_m , ermittelt. Nach einer Minute wurde zur Anregung der Photosynthese aktinisches Licht eingeschaltet (40 µmol m⁻² s⁻¹) und für drei bis vier Min. die Einstellung eines photosynthetischen Fließgleichgewichts (F_s) verfolgt. Zusätzliche sättigende Lichtpulse während der Belichtungsphase dienten der Bestimmung der Fluoreszenzlöschkoeffizienten qP [photochemische Fluoreszenzlöschung = $(F_m' - F_s) / (F_m' -$

F_0')] und qN [nicht photochemische Fluoreszenzlöschung = $1 - (F_m' - F_0') / (F_m - F_0)$; (Schreiber, 1986)] sowie der Quantenausbeute des PS II [$\Phi_{II} = (F_m' - F_s) / F_m'$; (Genty *et al.*, 1989)].

C. ERGEBNISSE

1. Molekulare Charakterisierung der α - und β -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine aus Tabak

1.1. Vergleichende Sequenz-Analyse der α - und β -Untereinheiten aus *N. tabacum*

1.1.1. α -Untereinheit

Der paarweise Vergleich der Proteinsequenzen der α -Untereinheit aus Tabak mit vier verschiedenen Klassen von α -Untereinheiten aus Säugetieren zeigt eine hohe Homologie im Bereich der GTP-Bindestelle (Abb. 2, G1 – G5) sowie in den Domänen, für die bei Transducin ($G_t\alpha$) eine Wechselwirkung mit der β -Untereinheit nachgewiesen wurde. Die Wechselwirkungs-Domänen befinden sich in der sogenannten „switch interface“-Region (Abb. 2, $\beta\gamma$ BR2) und am N-Terminus (Abb. 2, $\beta\gamma$ BR1) des α -Transducins (Lambright *et al.*, 1996). Bei Tabak sind die Aminosäuren, die den direkten Kontakt zur β -Untereinheit herstellen, konserviert, nämlich mehrere Aminosäuren der „switch interface“-Region und vier Aminosäuren des N-Terminus.

Die Modifikation der α - und γ -Untereinheiten mit Lipiden reguliert die subzelluläre Lokalisation und Funktion der heterotrimeren G-Proteine bei Säugetieren (Wedegaertner *et al.*, 1995). Alle bekannten α -Untereinheiten sind am N-Terminus mit Myristylsäure und / oder Palmitinsäure acyliert. Eine konservierte Myristoylierungsstelle befindet sich auch am N-Terminus der α -Untereinheit aus Tabak (Abb. 2, MGXXXS). Die α -Untereinheit aus Tabak enthält auch ein konserviertes Arginin, das in anderen α -Untereinheiten durch Cholera-Toxin modifiziert wird (Abb. 2, CTX). Ein Cystein am C-Terminus, das bei Säugetieren eine Modifikation durch Pertussis-Toxin ermöglicht, fehlt jedoch bei Tabak wie auch bei anderen bekannten α -Untereinheiten aus Pflanzen (Abb. 2, PTX).

```

-----βγBR1-----
                b   b   b   bb
bov_Goα1  -----MGCT-----LSAEERAALERSKAIEKNLKEDGISAAKDVKLLLLLGAGESG 45
bov_Giα1  -----MGCT-----LSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAREVKLLLLLGAGESG 45
bov_Gtα   -----MGAG-----ASAEEK----HSRELEKKLKEDAEDARTVKLLLLLGAGESG 41
bov_Gsα2  -----MGCLGNSKTEDQRNEEKQGREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLLLGAGESG 52
tob_G α1  MLCVVLENMGLLCS-RNKGYNQADDEENTQTADIERRIEQETKADKHIQKLLLLLGAGDSG 59
                MGXXXS                                     -----G1

```

bov_G α 1	LGIEYGDKERKADAKMVCDVVSRLMEDTEPFSPILLSAMMRLWGDSGIQECFNRSREYQLN	150
bov_G α 1	LKIDFGDSARADDARQLF-VLAGAAEEGFMTAELAGVIKRLWKDSGVQACFNRSREYQLN	149
bov_G α	LNQYGD SARQDDARKLM-HMADTIEEGTMPKEMSDIIQLRWKDSGIQACFDRASEYQLN	145
bov_G α 2	LVPPELANPENQFRVDYILSVMNVPDFDFPPEFYEHAKALWEDEGVRACYERSNEYQLI	172
top_G α 1	EASKYLLSAENKDIGEKLSEIGGRLDYPHLTKDLVODIEALWKDPAIOETILRGNELOVP	170

$\beta\gamma$ BR2-----
bbb b bb bbbb

bov_G ₀ α1	QRSERKKWIHCFEDVTAIIFCVALSGYDQVLHEDETTNRMHESLMLFDSICNNKFFIDTS	264
bov_G ₁ α1	QRSERKKWIHCFEGVTAIIFCVALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFDTDS	263
bov_G ₆ α	QRSERKKWIHCFEGVTCIIIFIAALSAYDMVLVEDDEVNRMHESLHLFNSICNHRYFATTS	259
bov_G ₅ α2	QRDERRKWIQCFNDVTAIIFVVAASSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTIS	286
tob_G α1	QRNERRKWIHLFEGVTAVIFCAAISEYDOTLFEDERKNRMETKELFEWVLKOPCFEKTS	290

bov_G ₀ α1	IILFLNKK DLFGEKIK--KSPLTICFPEYTGSNITYEDAAA-----YIQAQFE	309
bov_G ₁ α1	IILFLNKK DLFEEKIK--KSPLTICYPEYAGSNITYEEAAA-----YIQCFE	308
bov_G _t α	IVLFLNKK DVFSEKIK--KAHLSICFPDYNGPNTYEDAGN-----YIKVQFL	304
bov_G _s α2	VILFLNQ DLLAEKVLGKSKIETYDFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFL	346
tob_G α1	FMLFLNKF DIFEQKALKVPLNVCEWFKDYQPVSTGKQEIEH-----AYEFVKKKFE	341
---G4---		

		<i>PTX</i>
bov_G _o α1	SKN-RSPNKE---IYC-- HMTCATD TNNIQVVFDAVTDI I IANNLRG <u>CGLY</u>	354
bov_G _i α1	DLNKRKDTKE---IYT-- HFTCATD TKNVQVFVDAVDVI I KNNLKDC <u>GLF</u>	354
bov_G _t α	ELNMRRDVKE---IYS-- HMTCATD TQNVKFVFDAVTDI I IKENLKD <u>GLF</u>	350
bov_G _s α2	RISTASGDGR---HYCYP HSTCAVD TENIRRVFNDCRDI IQRMHLRQ <u>YELL</u>	394
tob_G α1	ESYFQCTAPDRVDRVFKIYSS TALD QKLVKKTFLVDETLRRRNLF <u>EAGLL</u>	392
	--G5---	

Abbildung 2. Sequenzvergleich der α -Untereinheit aus *N. tabacum* (tob_G α 1; Saalbach, 1999; Zugangsnummer P93397) mit G α 1 (bov_G α 1, Angus *et al.*, 1986; Zugangsnummer RGB001), G α 1 (bov_G α 1, Nukada *et al.*, 1986; Zugangsnummer RGB0I1), G α 1 (bov_G α ; Medynski *et al.*, 1985; Zugangsnummer PO4695) und G α 2 (bov_G α 2; Nukada *et al.*, 1986; Zugangsnummer RGB0GA) aus *Bos taurus*. Die Myristoylierungsstelle (MGXXXXS) und fünf GTP-Bindestelle-Regionen (G1 bis G5) sind fett dargestellt. Modifikationsstellen für

Cholera-Toxin (CTX) und Pertussis-Toxin (PTX) sind unterstrichen. Aminosäuren in den $\beta\gamma$ -Verbindungs-Regionen ($\beta\gamma$ BR1 und 2), die für Wechselwirkung mit der β -Untereinheit bei Transducin wichtig sind, sind mit „b“ gekennzeichnet (dabei sind die Aminosäuren, die bei Tabak konserviert sind fett, gekennzeichnet).

1.1.2. β -Untereinheit

Der paarweise Vergleich der β -Untereinheit aus *N. tabacum* mit den fünf verschiedenen β -Untereinheiten aus Säugetieren zeigt eine Identität zwischen 40 und 44%.

Die Homologie ist in der Region des β -Propellers sehr hoch, dagegen zeigt der N-Terminus mehr Variabilität sowohl zwischen verschiedenen $G\beta$ -Typen als auch zwischen β -Untereinheiten verschiedener Arten.

Die Strukturanalyse der β -Untereinheit des Transducins ($G_t\beta$) zeigte, daß drei Aminosäuren des WD-Motivs für die Wechselwirkung innerhalb des β -Propellers und für seine Struktur besonders wichtig sind: ein Aspartat zwischen der zweiten und dritten Proteinkette einer β -Faltblattstruktur, ein Histidin am Ende einer β -Faltblattstruktur, sowie ein Tryptophan am Ende des WD-Motivs (Sondek *et al.*, 1996). Diese Aminosäuren sind sowohl bei verschiedenen Typen der β -Untereinheit, als auch bei der β -Untereinheit aus Tabak identisch oder konservativ ausgetauscht (Abb. 3). Dies deutet darauf hin, daß die Struktur der β -Untereinheit aus Tabak ähnlich ist zur Struktur des $G_t\beta$.

Die Region des $G_t\beta$, die mit der α -Untereinheit interagiert, ist in der ersten, zweiten und dritten β -Faltblattstruktur des β -Propellers lokalisiert (Lambright *et al.*, 1996). Alle an dieser Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren sind bei Tabak konserviert (Abb. 3).

Beim Transducin sind für die Wechselwirkungen der β - mit der γ -Untereinheiten einerseits hydrophobe Interaktionen der N-terminalen α -Helix wichtig, andererseits spezifische Interaktionen im Bereich der fünften und sechsten β -Faltblattstruktur (Sondek *et al.*, 1996). Diese spezifischen Aminosäuren sind in der β -Untereinheit aus Tabak ebenfalls hoch konserviert (Abb. 3).

```

          g  g  gg  gg  g          gg  g  g          g  gg  g
hum_Gβ2  -----MSELEQLRQEAQELRNQIRDARKACGDSTLTQITAGLDP-----VGRIQMRTR 48
mou_Gβ4  -----MSELEQLRQEAQELRNQIQDARKACNDATLVQITSNMDS-----VGRIQMRTR 48
hum_Gβ1  -----MSELDQLRQEAQELKNQIRDARKACADATLSQITNNIDP-----VGRIQMRTR 48
hum_Gβ3  -----MGEMEQLRQEAQELKKQIADARKACADVTLAELVSGLEV-----VGRVQMRTR 48
mou_Gβ5  MATDGLHENETLASLKSEAESLKGKLEERAKLHDVELHQVAERVEA-----LGQFVMKTR 56
tob_Gβ3  -----MSVTELKERHMAATQTVSDLREKLKQKRLQLLDTDVSGYARSQGKTPVTFGPTDLVCC 58

```

--

	g	a	aa	g	a	a	gg	a	aa	a					
hum_Gβ2	RTL	R	G	H	LAKIYAMHWG	TDSRL	LV	SASQD	GKLI	I	W D SYTTNKVHAIP L RSSWVMTCAYAPS 108				
mou_Gβ4	RTL	R	G	H	LAKIYAMHWGY	DSRL	LV	SASQD	GKLI	I	W D SYTTNKMHAIP L RSSWVMTCAYAPS 108				
hum_Gβ1	RTL	R	G	H	LAKIYAMHWG	TDSRL	LV	SASQD	GKLI	I	W D SYTTNKVHAIP L RSSWVMTCAYAPS 108				
hum_Gβ3	RTL	R	G	H	LAKIYAMHWAT	DSKLL	LV	SASQD	GKLI	V	W D SYTTNKVHAIP L RSSWVMTCAYAPS 108				
mou_Gβ5	RTL	K	G	H	GNKVL	CMDWCKDK	RRI	VSSSQD	GKVIV	V	W D SFTTNKEHAV T MPCTWVMACAYAPS 116				
tob_Gβ3	RIL	Q	G	H	TGKVYSLD	WTPEKN	RIV	SASQD	GRLIV	V	W N ALTSQKTHAI K LPCA	WVMTCAFSPS 118			
	-----β7 β1-----β1 β2-----														
		a	a						a	a					
hum_Gβ2	GNF	VACGGL	DNIC	SI	Y SLKT---	REGN	VRVSREL	P	G H	TGYLSCCRFLD--DNQIITSSGD 163					
mou_Gβ4	GNV	VACGGL	DNIC	SI	Y NLKT---	REGD	VRVSREL	A	G H	TGYLSCCRFLD--DGQIITSSGD 163					
hum_Gβ1	GNV	VACGGL	DNIC	SI	Y NLKT---	REGN	VRVSREL	A	G H	TGYLSCCRFLD--DNQIVTSSGD 163					
hum_Gβ3	GNF	VACGGL	DNMC	SI	Y NLKS---	REGN	VKSREL	S	A H	TGYLSCCRFLD--DNNIVTSSGD 163					
mou_Gβ5	GCA	IACGGL	DNKCS	V	Y PLTFDK--	NENMA	AKKKS	SV	M H	TNYLSACSFTNS--DMQILITASGD 174					
tob_Gβ3	GQS	VACGGL	DSVCS	I	Y NLNSPIDK	DGNHP	VS	R M LS	G H	KGYVSSCQYVPDEDTHLITSSGD 178					
	-----β2 β3-----														
						a									
hum_Gβ2	TTC	AL	W D	IETG	QQT	VG	F-----	A G	H S	GDVMSLSLAP--DGRTFVSGAC D ASIKL W DVRDS 216					
mou_Gβ4	TTC	AL	W D	IETG	QQT	TT	F-----	T G	H S	GDVMSLSLSP--DLKTFVSGAC D ASSKL W DIRDG 216					
hum_Gβ1	TTC	AL	W D	IETG	QQT	TT	F-----	T G	H T	GDVMSLSLAP--DTRLFVSGAC D ASAKL W DVREG 216					
hum_Gβ3	TTC	AL	W D	IETG	QQ	K	TVF-----	V G	H T	GDVMSLAVSP--DFNLFISGAC D ASAKL W DVREG 216					
mou_Gβ5	GTC	AL	W D	VES	GQL	LQ	SF-----	H G	H G	ADVLC	LDLAPSETGNTFVSGG C DKKAM V DMRSG 229				
tob_Gβ3	QTC	VL	W D	ITT	GL	RTSV	FGGE	F Q S	G H	TADVQSVSISSS--NPRLFVSGSC D TTAR L W	DNRVA 237				
	-----β3 β4-----														
		g		a		gg		g	ggg	g					
hum_Gβ2	M-CR	QTFI	G H	ESDINA	VAFF	PNGYA	FTTG	SD D	D A	T C R L F D	LRADQELLMY S H---DNIICG 272				
mou_Gβ4	M-CR	QSFT	G H	ISDINA	VSFF	PSGYA	FATG	SD D	D A	T C R L F D	LRADQELLLY S H---DNIICG 272				
hum_Gβ1	M-CR	QTF	G H	ESDINA	ICFF	PNGNA	FATG	SD D	D A	T C R L F D	LRADQELMTY S H---DNIICG 272				
hum_Gβ3	T-CR	QTF	G H	ESDINA	ICFF	PNGEA	ICTG	SD D	D A	S C R L F D	LRADQELICF S H---ESIICG 272				
mou_Gβ5	Q-CV	QAF	E T	H	ESDVNS	VRYY	PSGDA	FASG	SD D	D A	T C R L Y D	LRADREVAIY S K---ESIIFG 285			
tob_Gβ3	SRA	QRTFY	G H	EGDVNT	VKFF	PDGN	RFGT	GS E D	G T	C R L F D	IRTGHQLQVYY Q PHG	DGDIPH 297			
	-----β4 β5-----β5														
		g	g	gg		g			g	gg					
hum_Gβ2	ITS	VAF	SR	S	G	RLLAGY	DD FNC	NI	W D	AMKGDRA----GVL AG H	DNRVSC LG VTD DGM AVA 328				
mou_Gβ4	ITS	VAF	S	K	S	G	RLLAGY	DD FNC	SV	W D	ALKGGRS----GVL AG H	DNRVSC LG VTD DGM AVA 328			
hum_Gβ1	ITS	V	S	F	S	K	S	G	RLLAGY	DD FNC	NV	W D	ALKADRA----GVL AG H	DNRVSC LG VTD DGM AVA 328	
hum_Gβ3	ITS	VAF	S	L	S	G	RLLAGY	DD FNC	NV	W D	SMKSERV----GIL SG H	DNRVSC LG VTD DGM AVA 328			
mou_Gβ5	ASS	V	D	F	S	L	S	G	RLLAGY	ND YT	INV	W D	V L K	GSRV---SIL F G H	ENRVSTL R VSPD GTA FC 341
tob_Gβ3	VT	SMA	F	S	I	S	G	RLLFV	GYS	N G	DCY V W	D	TLLAKVVLNLGGVQ NS	S H	EGRIS CL GLSADGSALC 357
	β6-----β6 β7-----														
		a		g	g										
hum_Gβ2	TGS	W	S	D	S	F	L	KI	W N	----- 340					
mou_Gβ4	TGS	W	S	D	S	F	L	RI	W N	----- 340					
hum_Gβ1	TGS	W	S	D	S	F	L	KI	W N	----- 340					
hum_Gβ3	TGS	W	S	D	S	F	L	KI	W N	----- 340					
mou_Gβ5	SGS	W	D	H	T	L	R	V	W A	----- 353					
tob_Gβ3	TGS	W	D	T	N	L	KI	W A	F	G	G	T	E	V 375	

Abbildung 3. Sequenzvergleich der β -Untereinheit aus *N. tabacum* (tob_G β 1; Kusnetsov und Oelmüller, 1996; Zugangsnummer X98161) mit G β 1 (hum_G β 1; Codina *et al.*, 1986; Zugangsnummer P04901), G β 2 (hum_G β 2; Fong *et al.*, 1987; Zugangsnummer P11016) und G β 3 (hum_G β 3; Levine *et al.*, 1990; Zugangsnummer P16520) aus *Homo sapiens*, sowie G β 4 (mou_G β 4; von Weizsaecker *et al.*, 1992; Zugangsnummer P29387) und G β 5 (mou_G β 5; Watson *et al.*, 1994; Zugangsnummer P54314) aus *Mus musculus*. Aminosäuren, die für die Wechselwirkungen innerhalb des β -Propellers bei β -Transducin wichtig sind, sind fett dargestellt, das Ende des WD-Motivs ist unterstrichen. Die β -Faltblattstrukturen sind unterhalb der Sequenz dargestellt (β 1 - β 7). Aminosäuren, die an der Wechselwirkung mit der α -Untereinheit des Transducins beteiligt sind, wurden mit einem „a“ über der Sequenz gekennzeichnet, die an der Wechselwirkung mit der γ -Untereinheit beteiligten Aminosäuren mit einem „g“. Aminosäuren, die bei Tabak konserviert sind, sind mit einem fetten „a“ bzw. „g“ gekennzeichnet.

1.2. Analyse der Kopienzahl von G β im Genom von *N. tabacum*

Genomische-DNA aus *N. tabacum* wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *XbaI* und *XhoI* behandelt, auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Nach der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten G β cDNA (Kusnetsov und Oelmüller, 1996), wurde die Membran bei mittlerer Stringenz gewaschen.

In jedem Restriktionsansatz sind drei starke Signale zu erkennen, zusätzlich auch drei oder vier schwächere Signale (Abb. 4). Das bedeutet, daß im Genom von *N. tabacum* mindestens zwei homologe Gene für die β -Untereinheit vorhanden sind, was bei einem allotetraploiden Organismus zu erwarten ist. Scheinbar liegt jeweils in einer der beiden homologen Sequenzen eine Restriktionsstelle des entsprechenden Enzyms, was zu drei Signalen bei der *Southern*-Analyse führte. Zusätzlich enthält das Genom anscheinend auch andere ähnliche Sequenzen (schwache Signale), die einen weiteren Typ der β -Untereinheit repräsentieren könnten.

Eine Datenbank-Suche zeigte, daß außer dem in unserer Arbeitsgruppe isolierten Gen für die β -Untereinheit (Kusnetsov und Oelmüller, 1996), noch zwei weitere homologe Sequenzen in *N. tabacum* und eine in *N. plumbaginifolia* existieren (Tabelle 1). Alle Gene zeigen zueinander auf DNA-Ebene eine hohe Homologie (96 - 98%) und können somit nicht die Ursache für die schwachen Signale bei der *Southern*-Analyse sein.

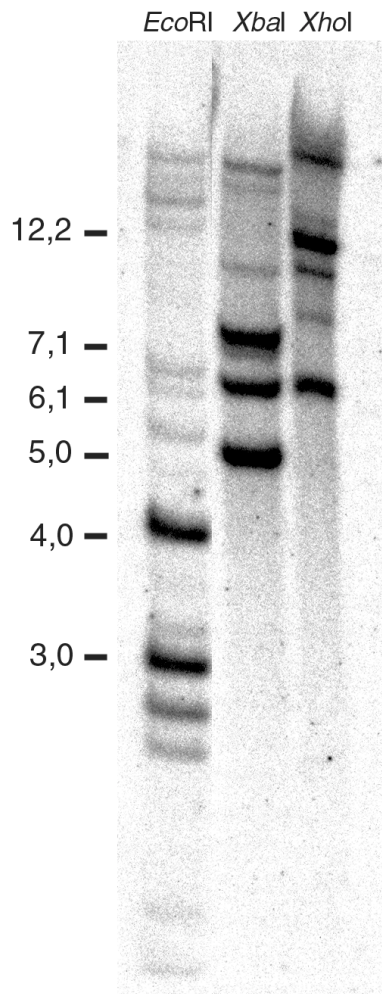


Abbildung 4. Analyse der Kopienzahl von G β im Genom von *N. tabacum*. Genomische DNA von *N. tabacum* wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *XbaI* und *XhoI* geschnitten, auf Nylonmembran transferiert und mit der radioaktiv markierten G β -cDNA hybridisiert. Der Längenstandard ist links in kBp angegeben.

	NpG β	NtG β 3	NtG β 2	NtG β 1
NtG β 1	97,6	97,6	98,1	100
NtG β 2	96,8	96,3	100	
NtG β 3	95,8	100		
NpG β	100			

Tabelle 1: Identität zwischen β -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine aus Tabak. Die Protein Sequenzen der β -Untereinheiten aus *N. tabacum* NtG β 1 (Zugangsnummer Z84820), NtG β 2 (Zugangsnummer Z84821), NtG β 3 (Kusnetsov und Oelmüller, 1996; Zugangsnummer X98161) und *N. plumbaginifolia* NpG β (Kaydamov *et al.*, 2000; Zugangsnummer Y09513) wurden paarweise verglichen. Der Grad der Identität ist in Prozent angegeben.

2. Die subzelluläre Lokalisation der β -Untereinheit (G β) in Tabakblättern

Die an der Signalübertragung beteiligten heterotrimeren G-Proteine sind im tierischen System mit der Plasmamembran assoziiert und werden durch Membranrezeptoren aktiviert (Pennington, 1994). Bei Pflanzen wurde eine Funktion bei der Lichtsignalkette postuliert (Warpeha *et al.*, 1991; Neuhaus *et al.*, 1993). Hier muß die Signalkette vom Zellinneren ausgehen, da die Lichtrezeptoren meistens nicht mit der Plasmamembran assoziiert sind. Es stellte sich nun die Frage, ob die durch heterotrimere G-Proteine vermittelte Signalkette bei Pflanzen im Cytoplasma abläuft oder ob das Signal zur Plasmamembran weitergeleitet werden muß. Zur Lokalisation der heterotrimeren G-Proteine in der Blattzelle, wurden deshalb Zellfraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Anti-G β Antikörpern analysiert.

2.1. Die Charakterisierung der Anti-G β Antikörper

Antikörper gegen G β aus Tabak mit eine N-terminale GST-Fusion wurden durch eine Affinitätschromatographie gegen die N-terminalen 54 Aminosäuren von G β gereinigt. Der N-terminale Teil von G β enthält keine WD-40 Motive, so daß eine Kreuzreaktion der aufgereinigten Antikörper mit anderen WD-40 Proteinen oder GST ausgeschlossen ist.

Wie *Western*-Analysen und Immunpräzipitationen zeigten, sind die gereinigten Anti-G β Antikörper spezifisch gegen G β . Die Antikörper erkannten ein 37-kDa großes Protein in der Membranfraktion aus Tabakblättern sowie das überexprimierte G β (11-375) (Abb. 5A). G β (11-375) ist kein GST Fusionsprotein und wurde auch nicht als Antigen für die Antikörper-Präparation verwendet. Das Präimmunserum zeigte keine Reaktion mit der Membranfraktion bzw. mit dem überexprimierten Protein (Daten nicht gezeigt).

Das *in vitro*-translatierte G β zeigte in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von 37 kDa und wurde mit dem Anti-G β Antiserum, jedoch nicht mit dem Präimmunserum, immunopräzipitiert (Abb. 5B).

2.2. G β läßt sich in der Membranfraktion und im Zellkern, aber nicht in Mitochondrien und Chloroplasten nachweisen

Zur subzellulären Lokalisation wurden zunächst Mikrosomen, die lösliche Zellfraktion (100.000 \times g Überstand) und gereinigte Zellkerne analysiert. G β konnte in Mikrosomen und

Zellkernen, aber nicht in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 6A, B). Auch Mitochondrien und Chloroplasten enthielten kein G β (Abb. 6C). Die Zellfraktionen wurden mit Hilfe fraktionsspezifischer Proteine charakterisiert, der Kalium-stimulierten Vandat-sensitiven ATPase für Mikrosomen (Briskin *et al.*, 1987), des RNA-bindenden Proteins UBP1 für den Zellkern (Filipowicz, persönliche Mitteilung), der 33-kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates vom Photosystem II für Chloroplasten (Tittgen *et al.*, 1986) und der Serinhydroxymethyltransferase für Mitochondrien (Henriksson und Eriksson, 1988). Es zeigte sich, daß heterotrimere G-Proteine in Pflanzen, wie auch bei Säugetieren, membrangebundene Proteine sind. Sie befinden sich auch im Zellkern oder sind mit dem Zellkern assoziiert.

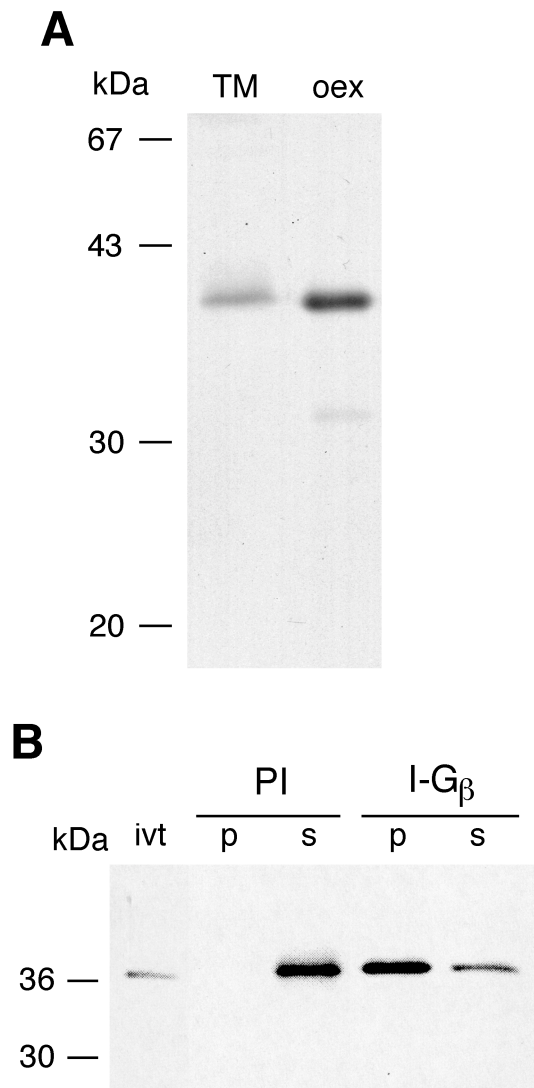


Abbildung 5. Die Charakterisierung der Anti-G β Antikörper. *Western-Analyse (A)* und *Autoradiogramm eines 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgels nach der Immunpräzipitation des radioaktiv markierten G β (B)*. oex, in *E. coli* überexprimiertes G β (11-375); TM, Membranfraktion aus Tabakblättern; PI, Präimmunserum; I-G β , Anti-G β -Serum; ivt, *in vitro* transkribiertes / translatiertes G β ; S, Überstand nach der Immunpräzipitation; P, Sediment nach der Immunpräzipitation. 20 ng überexprimiertes Protein und 60 ng Membranproteine wurden für die *Western-Analyse* auf das Gel aufgetragen. Nach der Immunpräzipitation wurden gleiche Mengen von Sedimenten und Überständen aufgetragen.

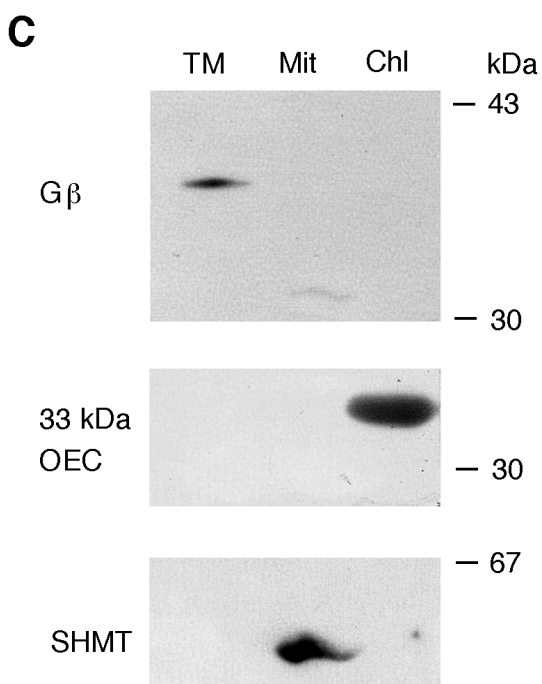
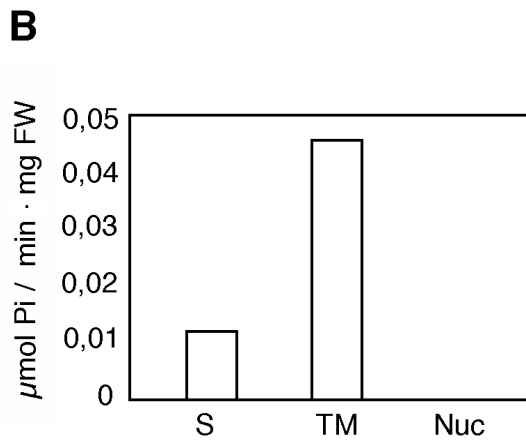
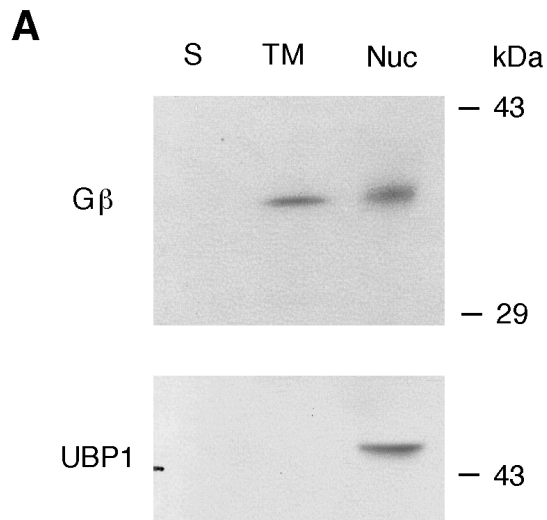


Abbildung 6. G β ist in der Membranfraktion und im Zellkern, aber nicht in Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert. **A.** Western-Analyse der Proteine aus der löslichen Fraktion (S), Membranfraktion (TM) und gereinigten Zellkernen (Nuc) der Tabakblätter. G β , Anti-G β Antikörper; UBP1, Antikörper gegen ein RNA-bindendes Protein aus dem Zellkern. **B.** Die Kalium-stimulierte Vandat-sensitive ATPase Aktivität wurde in den gleichen Fraktionen bestimmt. **C.** Western-Analyse der Proteine aus gereinigten Mitochondrien (Mit) und Chloroplasten (Chl) im Vergleich zur Membranfraktion (TM). 33 kDa OEC, Antikörper gegen die 33-kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates vom Photosystem II; SHMT, Antikörper gegen die Serinhydroxymethyltransferase aus Mitochondrien. Die Proteinmenge ist in jeder Spur gleich.

2.3. Trennung von Membranen aus Tabakblättern über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten

Zur Lokalisation von G β in Zellmembranfraktionen wurden Zellmembranen zunächst durch einen Saccharosegradienten, der 1 mM MgCl₂ enthielt, aufgetrennt. 1 ml Fraktionen wurden von oben nach unten abgenommen und mittels der spezifischen Enzymaktivitäten charakterisiert (Abb. 7). Die Vakuolenmembranen und die Membranen des Golgi Apparates fanden sich in den oberen, weniger dichten Gradientenfraktionen (Fraktionen 8 – 13, Abb. 7B), die Plasmamembranen und die Membranen des ER in den dichteren Gradientenfraktionen (Fraktionen 15 - 21, Abb. 7C). Die Fraktionen wurden weiter durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Anti-G β Antikörpern analysiert. Der größte Teil von G β befand sich in den mit Plasmamembranen und ER angereicherten Fraktionen (Abb. 8, 1 mM MgCl₂), dagegen war es in Vakuolenmembranen und Golgimembranen nicht nachweisbar.

Um die Plasmamembranen und die Membranen des ER voneinander zu trennen, wurden die Mikrosomen durch einen Saccharosegradienten, der 10 mM EDTA enthielt, aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen trennen sich die Ribosomen von den Membranen des ER, als Folge werden die Membranen in weniger dichte Gradientenzonen verschoben. Die ER-spezifische Enzymaktivität, die Cyanid-insensitive NADH⁺-Cytochrom-C-Reductase, erreichte das Maximum in Fraktion 13 (Abb. 7F), die größte Menge von G β wurde dagegen in den Fraktionen 16-19 nachgewiesen (Abb. 8, 10 mM EDTA). Damit wurde gezeigt, daß G β aus Mikrosomen überwiegend mit der Plasmamembran und nicht mit dem ER assoziiert ist.

2.4. G β ist in der Plasmamembran-Fraktion von Tabakblättern angereichert

Die Lokalisation von G β in Plasmamembranen wurde durch die Trennung von Mikrosomen im Zwei-Phasen System bestätigt (Abb. 9). Die Auftrennung von Membranvesikeln im Zwei-Phasen System beruht auf unterschiedliche spezifische Dichten und Oberflächen-Eigenschaften. Die Trennung ist stark von der Polymerkonzentration, Salzkonzentration und Temperatur abhängig, aber auch davon, aus welcher Pflanzenspezies die Vesikel isoliert werden (Hodges und Mills, 1986). Mit diesem System ist es möglich, unter spezifischen Bedingungen fast alle Zellmembranen voneinander zu trennen. Da die Membranoberfläche bei der Trennung eine wichtige Rolle spielt, lassen sich auch „right-side-out“ Vesikel von „inside-out“ Vesikeln der selben Membranfraktion unterscheiden (Palmgren *et al.*, 1990).

Die Bedingungen für die Isolation von Tabak-Plasmamembranen wurden so weit optimiert, daß eine Membranfraktion isoliert werden konnte, die drei- bis zehnmal mit Plasmamembranen angereichert war, wie aufgrund der Kalium-stimulierten Vandat-sensitiven ATPase Aktivität bestätigt wurde. Mikrosomen wurden dafür mit einem Dextran T 500 / Polyethylenglycol 3350 Zwei-Phasen System extrahiert. Beide Phasen wurden aufgrund der membranspezifischen Enzymaktivitäten charakterisiert und mit den Anti-G β Antikörpern analysiert. Die Plasmamembranen befanden sich in der oberen Phase und wurden auf diese Weise von anderen Membranvesikeln getrennt. Die *Western*-Analyse zeigte, daß G β nur in der oberen Phase vorhanden ist und bestätigt somit, daß G β aus Mikrosomen ein Plasmamembran-gebundenes Protein ist.

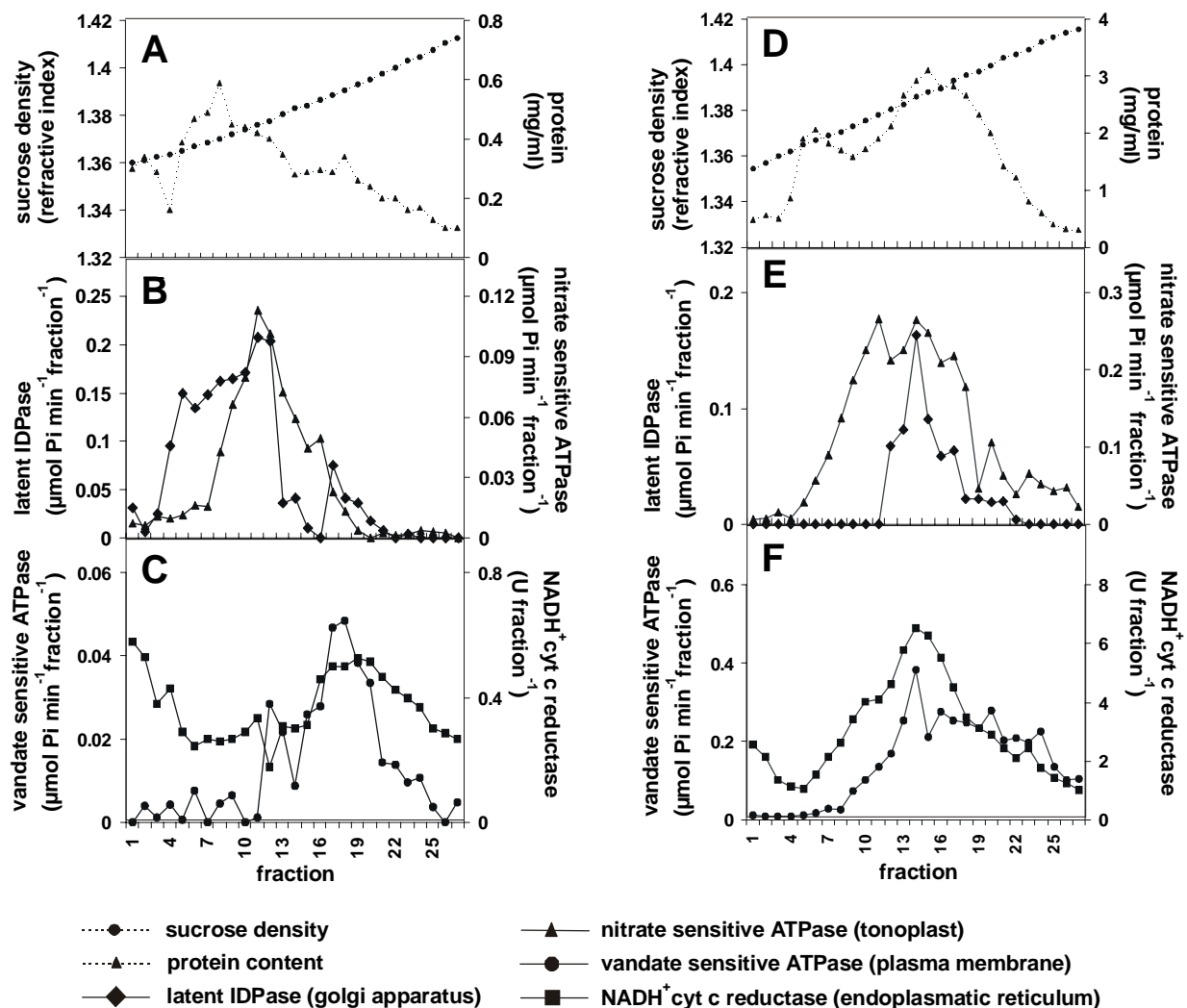


Abbildung 7. Trennung von Membranen aus Tabakblättern über kontinuierliche Saccharosegradienten (15 – 50% w/w), die 1 mM MgCl₂ (A – C) bzw. 10 mM EDTA (D – F) enthielten. Die Gradienten wurden von oben

nach unten in 30 Aliquots von je 1 ml fraktioniert. Proteingehalt und Aktivitätsprofile der membranspezifischen Enzyme sind gegen die Saccharosegradienten-Fractionen aufgetragen.

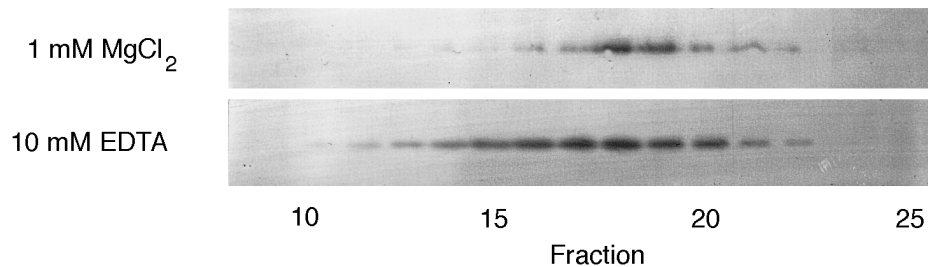
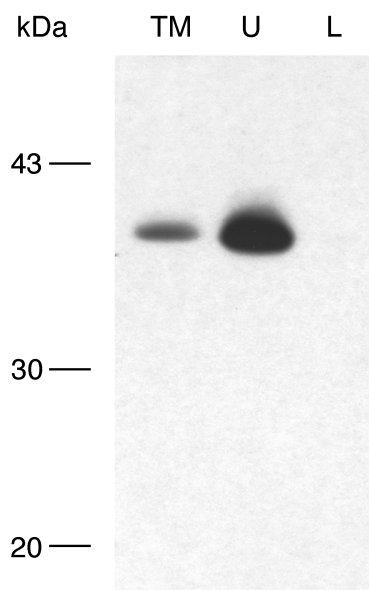


Abbildung 8. Western-Analyse mit Anti G β Antikörpern der Saccharosegradienten-Fractionen (vgl. Abb. 7). Gleiche Volumina jeder Fraktion wurden auf das Gel aufgetragen.

A



B

	Enzyme activity ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$)		
	TM	U	L
vanadate sensitive ATPase (PM)	0.2	0.582	0.078
nitrate sensitive ATPase (tonoplast)	0.11	0.21	0.11
cyt-C-oxidase (mitoch.)	0.075	0	0.082
NADH + cyt-C-reductase (ER)	0.83	1.59	1.23

Abbildung 9. G β ist in der Plasmamembran-Fraktion von Tabakblättern angereichert. **A.** Western-Analyse der Mikrosomen (TM) und Membranfraktionen nach der Trennung im Zwei-Phasen System. U, obere Phase; L, untere Phase des Zwei-Phasen Systems. Gleiche Mengen an Protein wurden aufgetragen. **B.** Die Aktivitäten der membranspezifischen Enzyme wurden in den beiden Fraktionen bestimmt.

3. Regulation der Menge des membrangebundenen G β -Proteins

3.1. Die Menge an G β ist vom Entwicklungsstadium der Blätter abhängig

Untersuchungen an der α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine in *Arabidopsis* zeigten, daß Meristeme und junges Gewebe eine höhere Menge an G α aufweisen als älteres Gewebe (Weiss *et al.*, 1993). Dies könnte bedeuten, daß die heterotrimeren G-Proteine eine wichtige Rolle während der Entwicklung spielen. Aufgrund dieser Daten stellte sich die Frage, ob die Menge an membrangebundenem G β bei Tabak in gleicher Weise während verschiedener Entwicklungsstadien des Blattes variiert.

Mikrosomen aus den ersten fünf Blättern einer Tabakpflanze wurden isoliert und mit den Anti-G β Antikörpern analysiert. Es zeigte sich, daß sich die Menge von membrangebundenem G β während der Blattentwicklung verändert (Abb. 10). Die jungen, noch im Wachstum begriffenen Blätter enthalten eine hohe Menge an membrangebundenem G β , während sie bei älteren, vollentwickelten Blättern reduziert ist.

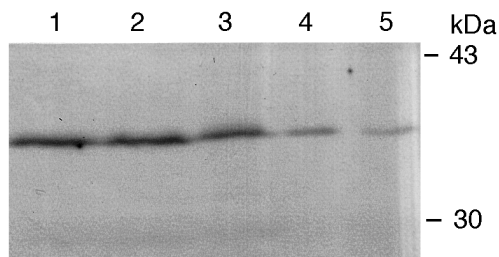


Abbildung 10. Die Menge von G β in der Membranfraktion ändert sich während der Blattentwicklung. Aus den ersten fünf Blättern einer 12 Wochen alten Tabakpflanze wurden Mikrosomen isoliert und mit den Anti-G β Antikörpern analysiert. Die Spuren 1 bis 5 entsprechen den Blättern von oben nach unten, die Proteinextrakte sind aufgrund des gleichen Frischgewichts verglichen.

3.2. Licht und Phytohormone zeigen keine Wirkung auf die Menge an membrangebundenem G β

Licht und Phytohormone, vor allem Cytokinine und Abscisinsäure, haben eine starke Wirkung auf das Blattwachstum und die Entwicklung der Chloroplasten. Die Expression

kernkodierter Chloroplastenproteine wird durch Licht und Cytokinine stimuliert, durch Abscisinsäure dagegen reprimiert (Kusnetsov *et al.*, 1994).

Es wurde die Wirkung von Licht auf die Entwicklung von Tabakkeimlingen untersucht. Dazu wurden die im Dunkeln aufgezogenen Tabakkeimlinge für sechs bis 72 Stunden ins Licht gestellt, die Mikrosomenfraktionen daraus isoliert und anschließend mit anti-G β Antikörpern analysiert. Die Menge von G β bleibt im Dunkeln und nach der Lichtinkubation gleich (Abb. 11).

Zur Untersuchung der Phytohormonwirkung wurden etioliierte *Lupinus*-Kotyledonen auf einem mit Wasser, Cytokinin (Benzylaminopurin; 0,022 mM) bzw. Abscisinsäure (0,076 mM) getränktem Filterpapier für drei Tage im Dunkeln inkubiert. Die etioliierten *Lupinus*-Kotyledonen sind gegen Licht und Phytohormone sehr empfindlich. Cytokinin aktiviert die Expression der 33-kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates, während Abscisinsäure die Expression reprimiert. Die Menge von membrangebundenem G β ist jedoch durch Phytohormone nicht beeinflussbar (Abb. 12).

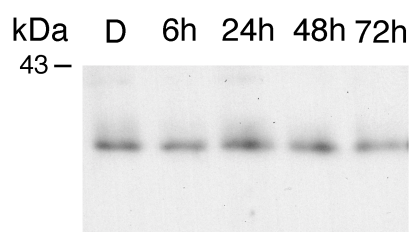


Abbildung 11. Gehalt an membrangebundenem G β in Abhängigkeit von Licht. Im Dunkeln aufgezogene Tabakkeimlinge (D) wurden für 6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h im Licht inkubiert. Die Mikrosomen wurden aus den Keimlingen isoliert, auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Anti-G β Antikörpern analysiert.

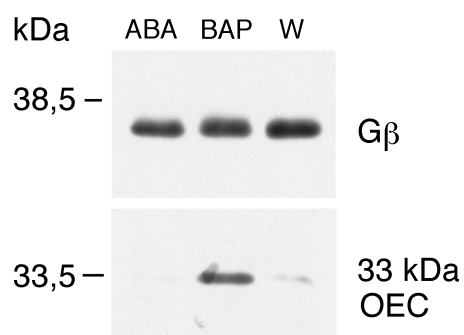


Abbildung 12. Gehalt an membrangebundenem G β in Abhängigkeit von Phytohormonen. Western-Analyse der Mikrosomen aus etioliierten *Lupinus*-Kotyledonen, die mit Abscisinsäure (ABA), Benzylaminopurin (BAP), oder Wasser (W) inkubiert wurden. Die Proteine wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. G β , Anti-G β Antikörper; 33 kDa OEC, Antikörper gegen die 33-kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates vom Photosystem II.

4. Biochemische Analyse der β -Untereinheit in Membranfraktionen

4.1. G β ist durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran assoziiert

Zur Untersuchung der Verankerung von G β in der Membran wurden Mikrosomen mit hohen Salzkonzentrationen, Harnstoff, Cholat bzw. alkalischer Lösung extrahiert. Die extrahierten Proteine und die verbliebenen Mikrosomenfraktionen wurden auf Proteingelen aufgetrennt und mit Antikörpern gegen G β analysiert (Abb. 13). Es zeigte sich, daß G β weder mit hohen Salzkonzentrationen noch mit der alkalischen Lösung aus der Membran extrahiert werden kann. Harnstoff extrahierte nur geringe Mengen des Proteins, Cholat dagegen mehr als die Hälfte. Dies bedeutet, daß G β durch starke hydrophobe Wechselwirkungen in der Membran verankert ist. Das Hydropathie-Profil von G β nach Kyte und Doolittle (1982) weist darauf hin, daß das Protein keine hydrophoben Domänen besitzt, die als Membrananker wirken könnten (Abb. 14). Trotzdem verhält sich G β wie ein integrales Membranprotein.

4.2. G β existiert in der Plasmamembran als Komponente eines 630 kDa großen Komplexes

4.2.1. Trennung der Proteinkomplexe mit Hilfe der Blue-native-PAGE

Blue-native-PAGE ist eine Methode, die für die Trennung von Membranproteinkomplexen in nativer Form entwickelt wurde (Schägger und Jagow, 1991). Durch die Anwendung von Coomassie G-250 erhalten die Proteinkomplexe eine negative Ladung und werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Bindung von Coomassie an die Proteine stabilisiert zusätzlich die Proteinkomplexe während der Elektrophorese. ϵ -Aminocapronsäure verbessert die Solubilisierung der Membranen mit neutralen Detergenzien und dient somit als Ersatz für Salze, die während der Elektrophorese stören könnten.

Zur Analyse der nativen Form heterotrimerer G-Proteine aus Tabak-Plasmamembranen wurden Mikrosomen mit verschiedenen Detergenzien gelöst, mit Coomassie G-250 vermischt und auf einem nativen Polyacrylamidgel in Gegenwart von Coomassie im Laufpuffer aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Hybond-P-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen G β analysiert.

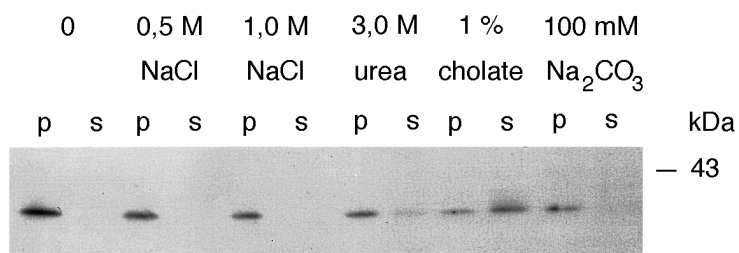


Abbildung 13. G β ist durch hydrophobe Wechselwirkung mit der Membran assoziiert. Mikrosomen wurden aus jungen Tabakblättern isoliert und mit 0,5 M NaCl, 1M NaCl, 3 M Harnstoff oder 100 mM Na₂CO₃ extrahiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Membranen analysiert (0). Nach der Zentrifugation bei 100.000 \times g wurden gleiche Mengen vom Überstand (S) und vom Sediment (P) auf einem 10 - 17%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Anti-G β Antikörpern analysiert.

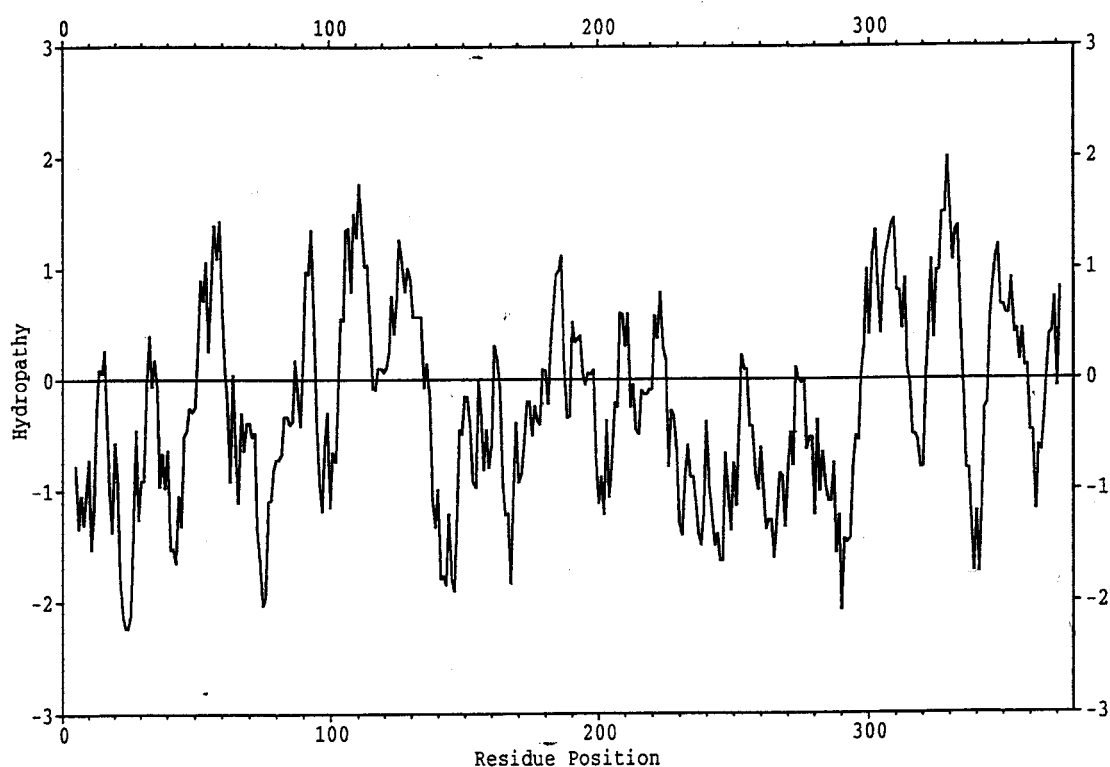


Abbildung 14. Hydropathie-Profil des G β 3 aus *N. tabacum*. Die Aminosäuresequenz wurde nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982) analysiert.

Bei der Anwendung milder, neutraler Detergenzien (Dodecyl- β -D-maltosid, Digitonin oder n-Octylglucosid), befindet sich G β in einem Proteinkomplex, der ein wenig oberhalb des Molekulargewichtsmarkers Thyroglobulin (669 kDa) läuft. Dagegen konnte dieser Komplex mit 3%-igem Triton X-100 teilweise, mit SDS jedoch vollständig gelöst werden (Abb. 15).

Um zu bestätigen, daß sich G β in diesem Komplex befindet und um die Möglichkeit einer unspezifischen Kreuzreaktion im nativen *Western* auszuschließen, wurde eine Spur nach der nativen Elektrophorese in einer zweiten Dimension durch denaturierende Elektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Die Hauptmenge von G β ist unter den Bedingungen der *Blue-native*-PAGE offensichtlich in dem hochmolekularen Komplex lokalisiert, während ein geringer Teil vermutlich dissoziierte und dadurch das verschmierte *Western*-Signal hervorrief (Abb. 16).

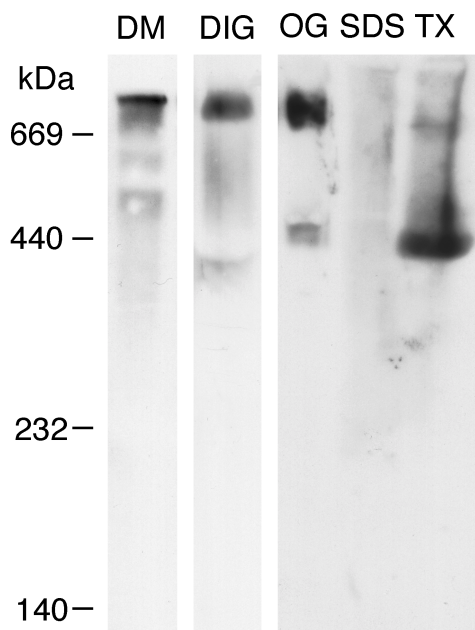


Abbildung 15 *Western*-Analyse von G β nach der Auftrennung mikrosomaler Proteinkomplexe auf einem *Blue-native*-Polyacrylamidgel. Die Membranen wurden mit 1% (w/v) Dodecyl- β -D-maltosid mit 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure (DM), 1% (w/v) Digitonin (DIG), 0,1% (w/v) n-Octylglucosid mit 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure (OGL), 1% (w/v) SDS oder 3% (v/v) Triton X-100 mit 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure (TX) gelöst. Die Größen der Molekulargewichtsmarker für die *Blue-native*-PAGE sind links angegeben.

4.2.2. Trennung der Proteinkomplexe durch Gelfiltrations-Chromatographie

Die *Blue-native*-PAGE wies darauf hin, daß sich G β in einem ca. 680 kDa großen Proteinkomplex befindet. Um das Molekulargewicht dieses Komplexes sowie die Größe des heterotrimeren G-Proteins genauer zu bestimmen, wurden in einem weiteren Experiment Membranproteine nach der Solubilisierung durch eine Gelfiltrations-Chromatographie aufgetrennt. Dazu wurden Plasmamembranen mit 1% (w/v) Cholat bzw. 1% (w/v) Dodecyl- β -

D-maltosid gelöst und auf eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-300-Säule aufgetragen. Die Gelfiltrations-Fractionen wurden mit Anti-G β Antikörpern analysiert.

Das Elutionsprofil der mit Cholat gelösten Membranen zeigt, daß G β ab der Fraktion 20 eluiert wird und dabei Maxima bei den Fraktionen 20 und 32 bis 34 aufweist (Abb. 17A). Die Hauptmenge des Proteins, ca 80%, wurde in den Fraktionen 32 – 34 eluiert. Die Kalibrierung der Gelfiltrations-Säule ergab, daß das Maximum I einem Protein von 630 kDa, das Maximum II einem Protein von 120 kDa entspricht. G β scheint also eine Komponente eines 630 kDa großen Proteinkomplexes zu sein, der durch die Behandlung mit Cholat größtenteils dissoziiert und dadurch G β als ein 120 kDa großes Protein freisetzt. Dies entspricht dem Molekulargewicht heterotrimerer G-Proteine aus Säugetieren, was darauf hinweist, daß G-Proteine aus Tabak-Plasmamembranen ebenfalls Heterotrimere sind, deren noch zu identifizierende γ -Untereinheit wie bei Säugetieren ungefähr 8 bis 10 kDa groß ist.

Wenn die Membranen mit Dodecyl- β -D-maltosid gelöst wurden, unterschied sich das Elutionsprofil von G β . Ungefähr die Hälfte von G β wurde als ein 630 kDa großer Proteinkomplex (Fraktionen 20 bis 22, Abb. 17B) eluiert, das 120 kDa große Protein fehlte jedoch.

Scheinbar ist unter diesen Bedingungen der 630 kDa Komplex stabiler und nur teilweise dissoziiert, was ein breiteres Maximum verursachte. Dies ist vergleichbar mit dem Ergebnis, das man bei der *Blue-native*-PAGE erhält.

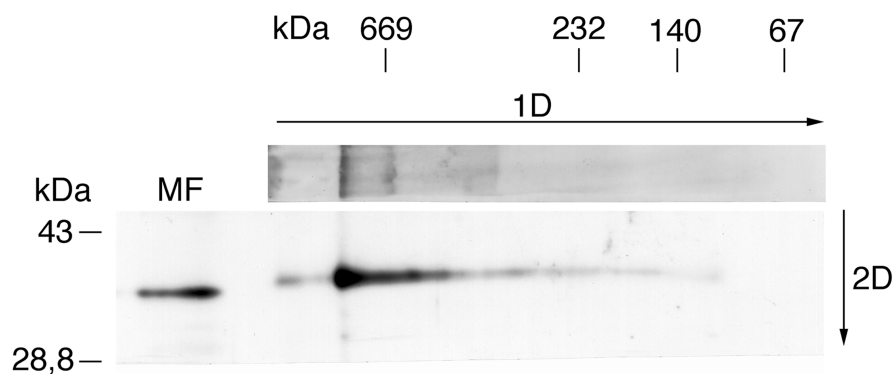
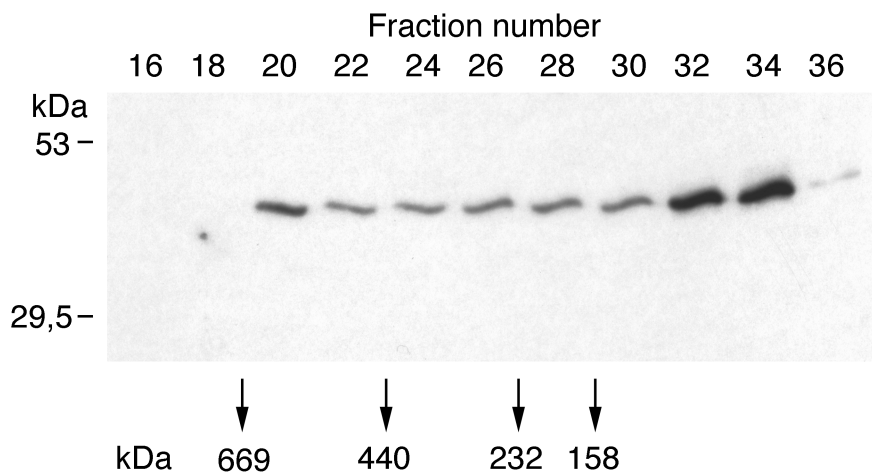


Abbildung 16. Western-Analyse von G β nach der Auftrennung mikrosomaler Proteinkomplexe in einer ersten, nativen (1D) und einer zweiten, denaturierenden (2D) Dimension. Mikrosomen wurden mit 1% (w/v) n-Octylglucosid und 750 mM ϵ -Aminocapronsäure gelöst und auf einem *Blue-native*-Gel analysiert. Die Spur wurde ausgeschnitten, um 90 Grad gedreht, auf ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel gelegt und die Proteine

erneut elektrophoretisch aufgetrennt. Von links nach rechts sind die Größen der Molekulargewichtsmarker der *Blue-native*-PAGE angegeben, von oben nach unten der zweiten denaturierenden Elektrophorese. MF, Gesamtmembranen aus Tabakblättern.

A



B

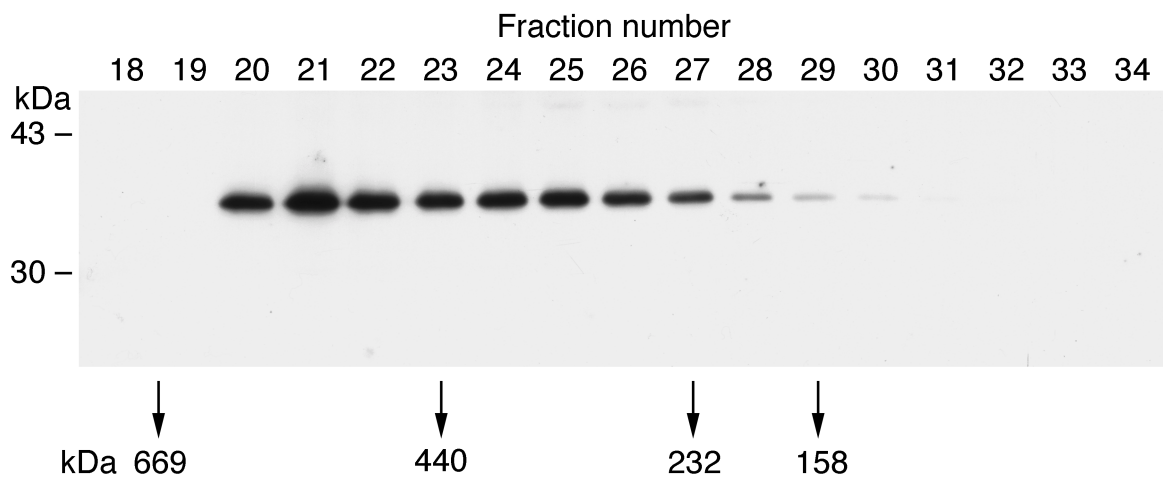


Abbildung 17. Nachweis von G β in den Fraktionen der Gelfiltrations-Chromatographie. Plasmamembranen aus Tabakblättern wurden mit 1% (w/v) Cholat (A) oder 1% (w/v) Dodecyl- β -D-maltosid mit 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure (B) gelöst und durch eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-300-Säule aufgetrennt. Gleiche Volumina der Fraktionen wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Größen der Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE sind links eingezeichnet, die Elutionsmaxima der Gelfiltrationsmarker unten.

4.3. Identifizierung und Charakterisierung von Triton X-100 unlöslichen Plasmamembran-Subfraktionen in höheren Pflanzen

Bei Säugetieren wurden in verschiedenen Zelltypen Detergenz-unlösliche Plasmamembran-Mikrodomänen beschrieben, die mit Sphingolipiden und Cholesterol angereichert sind (Anderson, 1998). Eine mögliche Funktion dieser Domänen in der Plasmamembran ist die Konzentration von an der Signalübertragung beteiligten Komponenten, die dadurch eine Regulation verschiedener Signalketten innerhalb einer Zelle ermöglichen könnte (Shaul und Anderson, 1998).

Bei der biochemischen Charakterisierung der β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine aus Tabak wurde beobachtet, daß es unmöglich ist, das Protein durch Detergenz-Behandlung vollständig aus der Membran zu lösen (z.B. Abb. 13). Ein Teil des Proteins bleibt selbst unter verschiedensten Bedingungen der Detergenz-Behandlung immer unlöslich. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Untersuchungen von Plasmamembranen aus *Arabidopsis* erhalten. Dies deutet darauf hin, daß die Plasmamembran höherer Pflanzen bestimmte Detergenz-unlösliche Domänen besitzt, die bei der Funktion der heterotrimeren G-Proteine eine Rolle spielt.

4.3.1. Isolierung Triton X-100-unlöslicher Vesikel aus Plasmamembranen von Tabak

Die Detergenz-unlöslichen, mit Glycolipiden angereicherten Membrandomänen aus Säugetierzellen lassen sich aufgrund ihres hohen Lipidgehalts als eine spezifisch leichte Fraktion isolieren. Das gleiche Prinzip wurde zur Isolierung von Plasmamembran-Subfraktionen aus Tabakblättern verwendet. Dazu wurden Plasmamembranen mit 1%-igem Triton X-100 bei 4°C gelöst und mit einem kontinuierlichen Saccharosegradienten überschichtet. Die Triton X-100 unlöslichen Membranfraktionen flotieren nach der Zentrifugation als milchige Bande in der Mitte des Gradienten. Bei Verwendung eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten befand sich die Triton X-100-ungelöste Fraktion in der Interphase zwischen der 30%igen und der 35%igen Saccharosestufe.

Um auszuschließen, daß es sich bei den erhaltenen Fraktionen um unspezifische Aggregationen von Proteinen während der Solubilisierung handelte, wurde untersucht, ob diese Fraktionen auch mit Hilfe anderer Methoden gewonnen werden können. Dazu wurden Plasmamembranen mit Ultraschall behandelt und anschließend auf einem kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt. Nach der Zentrifugation konnten zwei Plasmamembran-

Subfraktionen voneinander unterschieden werden, wobei die spezifisch leichtere Subfraktion die gleiche Dichte wie die Triton X-100-unlösliche Fraktion hatte (Abb. 18).

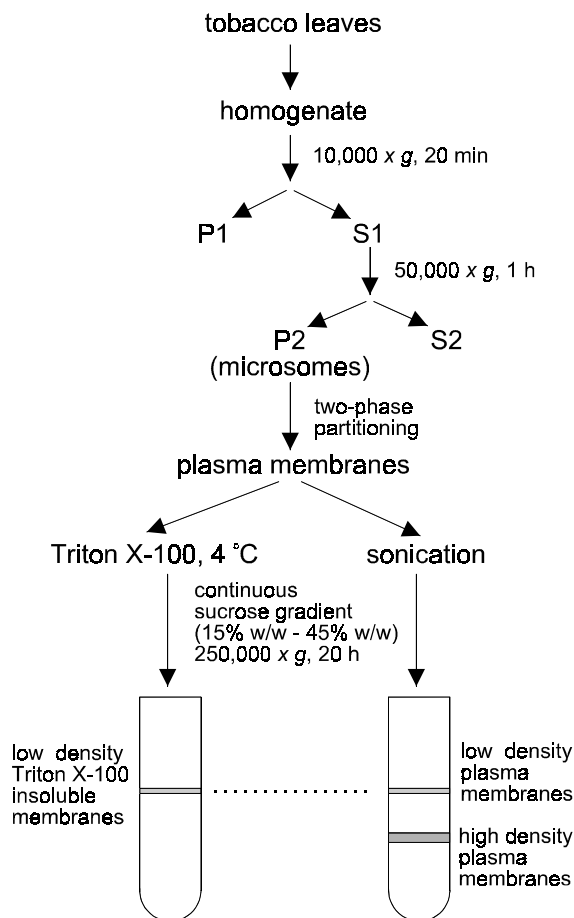


Abbildung 18. Schema zur Isolierung der Triton X-100-unlöslichen Membranfraktion aus Tabakblättern. Die genaue Prozedur zur Isolation wurde unter „Material und Methoden“ beschrieben.

Die Triton X-100-unlösliche Fraktion und die nach der Ultraschallbehandlung isolierte, spezifisch leichte Subfraktion wurden durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie weiter untersucht (Abb. 19). Der größte Teil der Triton X-100-unlöslichen Vesikel hatte einen Durchmesser von 100 bis 400 nm, nur etwa 30% waren größer (400 nm – 1,3 µm). Durch Ultraschall isolierte, spezifisch leichte Vesikel waren mit einem Durchmesser zwischen 50 und 150 nm wesentlich kleiner und homogener. Es ist möglich, daß ursprünglich kleine Membrandomänen durch die Detergenz-Behandlung verschmelzen, wodurch unterschiedlich große Vesikel entstehen können.

Durch beide Isolierungsmethoden erhält man Vesikel, die intramembrane Partikel enthalten. Diese Partikel stellen integrale Membrankomplexe dar, die oft zu noch größeren Komplexen mit einer Größe von 40 bis 80 nm aggregieren (Abb. 19B und C). Bei Plasmamembran-Vesikeln vor der Triton X-100- bzw. Ultraschall-Behandlung wurden ähnliche Partikel-Aggregate seltener beobachtet (Abb. 19A).

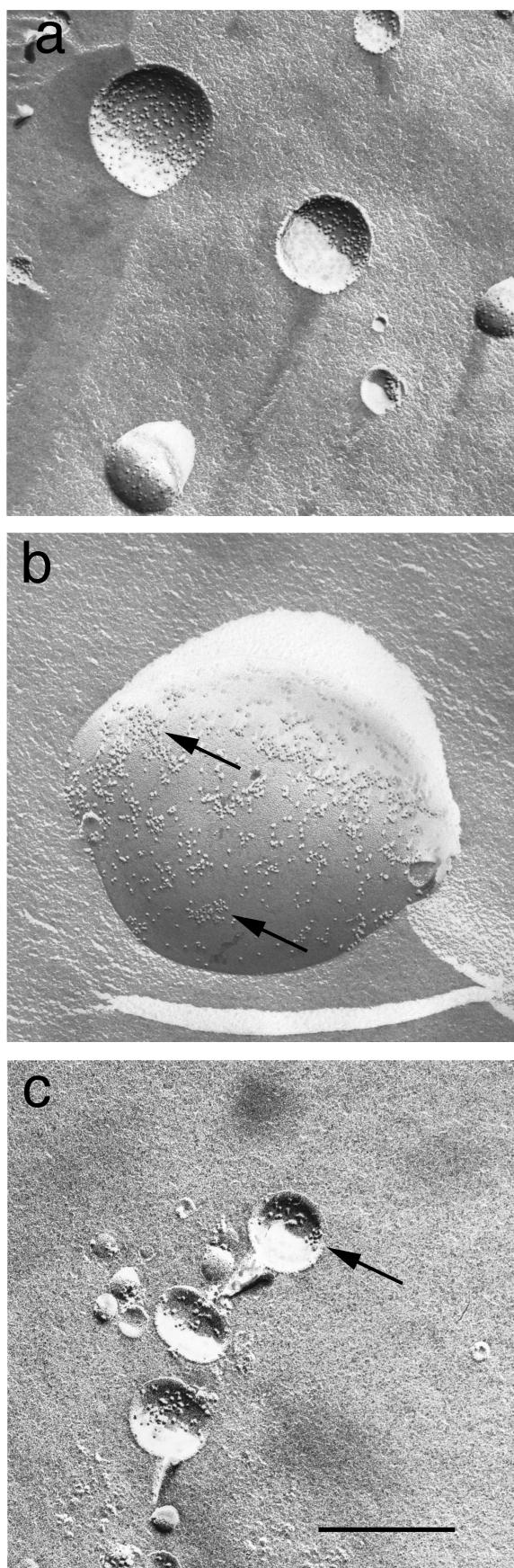


Abbildung 19. Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie von Plasmamembran-Fractionen (**a**) und spezifisch leichter Plasmamembran-Subfraktionen nach der Behandlung mit Triton X-100 (**b**) oder nach Ultraschallbehandlung (**c**). Die Pfeile weisen auf die Aggregate der Proteinkomplexe bei den spezifisch leichten Subfraktionen hin. Balken = 400 nm

4.3.4. G β befindet sich in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion

Der Nachweis von G β in der Triton X-100-unlöslichen Plasmamembran-Fraktion erfolgte durch Immun-Elektronenmikroskopie und Western-Analyse. Zur Immun-Elektronenmikroskopie wurden die Triton X-100-unlöslichen Vesikel mit Anti G β Antikörpern inkubiert und anschließend mit 10-nm Goldpartikeln markiert.

Das elektronenmikroskopische Bild der Gefrierbruchmarkierung zeigt ein Membranvesikel mit intramembranen Partikeln (Abb. 20A, Pfeil). Die Goldpartikel markierten spezifisch die Vesikel-Oberfläche, sind jedoch nicht gleichmäßig über die Oberfläche verteilt, sondern scheinen an bestimmten Stellen konzentriert zu sein (Abb. 20, Pfeilspitzen). Die Markierung ist aber nicht auf die intramembranen Partikel begrenzt.

Die mit Uranylacetat negativ gefärbten Vesikel zeigen das gleiche Markierungsmuster, was die Ergebnisse der Gefrierbruchmethode bestätigt (Abb. 20B).

Um den Anteil von G β in Triton X-100-unlöslichen Plasmamembran-Domänen zu bestimmen, wurden die Plasmamembranen nach der Behandlung mit Triton X-100 auf den kontinuierlichen Saccharosegradienten getrennt und nach der Zentrifugation fraktioniert. Gleiche Volumina der Fraktionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Antikörpern gegen G β analysiert.

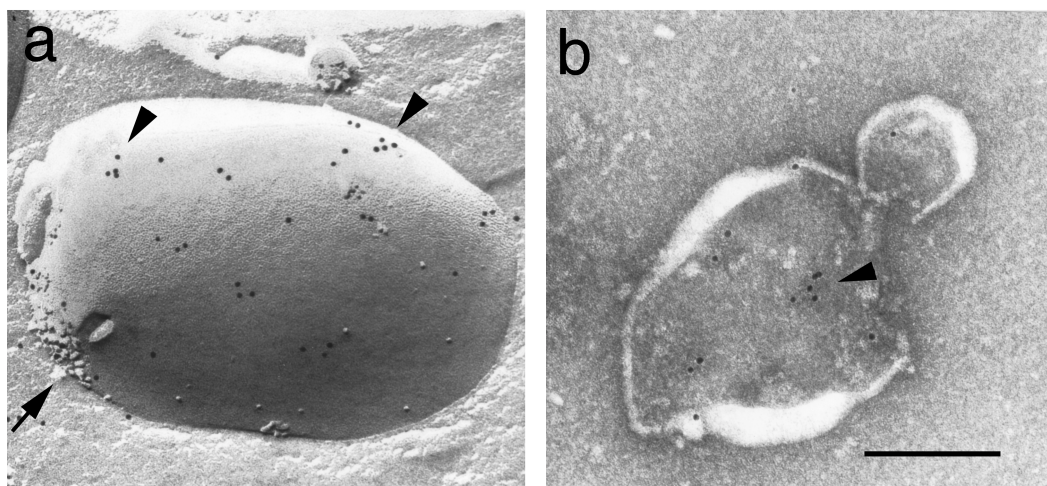


Abbildung 20. Immunolokalisation von G β in der Triton X-100-unlöslichen Plasmamembran-Subfraktion. G β wurde mit 10-nm Goldpartikeln auf der Gefrierbruchreplika (a) und negativ gefärbten Vesikeln (b)

immunmarkiert. Die Markierung ist überwiegend auf bestimmte Stellen konzentriert (Pfeilspitzen) und findet sich auch außerhalb der Region mit intramembranen Partikeln (Pfeil). Balken = 200 nm

Abbildung 21 zeigt, daß sich etwa 15% des G β in den Triton X-100-unlöslichen Plasmamembran-Domänen (Fraktionen 5 und 6) befinden, während der Rest des Proteins noch in der Beladungszone in gelöster Form verweilt (Fraktionen 10 - 12). Ein ähnliches Verhältnis von gelöstem zu ungelöstem Protein ist für G α (Li *et al.*, 1995) sowie für G α und G β in Hefe beschrieben (Kubler *et al.*, 1996).

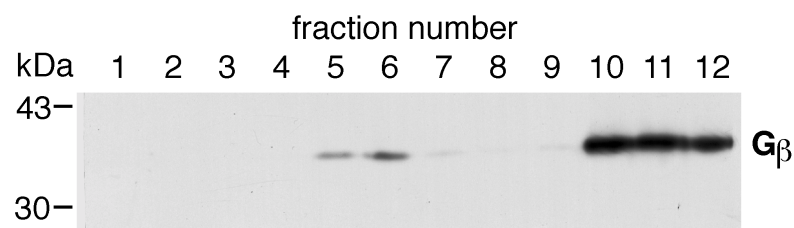


Abbildung 21. Verteilung von G β in Plasmamembran-Mikrodomänen. Die Plasmamembranen wurden nach der Behandlung mit Triton X-100 durch einen kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt, der anschließend von oben nach unten fraktioniert wurde (Fraktionen 1 – 12). Gleiche Volumina der Fraktionen wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Anti-G β Antikörpern analysiert.

4.3.2. Protein-Analyse der Triton X-100-unlöslichen Membrandomänen

Die Proteine der Plasmamembran und der Triton X-100-unlöslichen, spezifisch leichten Plasmamembran-Subfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung nachgewiesen. Es zeigte sich, daß das Proteinmuster der Plasmamembran von dem der spezifisch leichten Subfraktionen deutlich unterschiedlich ist (Abb. 22). Der größte Teil der Plasmamembranproteine ließ sich in spezifisch leichten Subfraktionen nicht nachweisen, dagegen wurden einige Proteine in diesen Subfraktionen spezifisch angereichert, beispielsweise Proteine mit dem Molekulargewicht von 28, 30, 32, 34, 40, 45, 50 und 67 kDa.

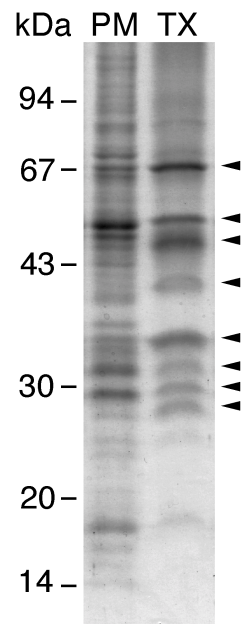


Abbildung 22. Das Proteinmuster der Plasmamembranen (PM) und Triton X-100-unlöslichen Membranen (TX) aus Tabak. Gleiche Proteinmengen wurden auf einem 10 – 17%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Angereicherte Proteine in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion wurden gekennzeichnet.

4.3.3. Identifizierung GPI- verankerter Proteine in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion

GPI-verankerte Proteine sind oft in Detergenz-unlöslichen Membrandomänen aus Säugetierzellen angereichert. Ihre Assoziation mit den Detergenz-unlöslichen Membranen wird durch Cholesterol und Sphingolipide beeinflusst (Harder und Simons, 1997). GPI-verankerte Proteine lassen sich durch eine Triton X-114 Extraktion nach Behandlung mit Phosphatidylinosit-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) isolieren. Als Folge der Behandlung mit PI-PLC wird die Lipid-Komponente (GPI) des Proteins abgespalten, wodurch das Protein aus der Triton X-114- Phase in die wäßrige Phase übergeht.

Um die Triton X-100-unlösliche Fraktion aus Pflanzen auf das Vorkommen von GPI-verankerten Proteinen zu untersuchen, wurden Plasmamembranen mit Biotin markiert und mit Triton X-100 behandelt. Mit dem Zwei-Phasen-System isolierte Plasmamembran-Vesikel sind hauptsächlich „right-side-out“-Vesikel, weshalb überwiegend die Proteine auf der Zelloberfläche markiert werden (Palmgren *et al.*, 1990). Nach der Auftrennung auf einem Saccharosegradienten wurden die Triton X-100-unlöslichen Vesikel einer Triton X-114 Extraktion in Gegenwart oder in Abwesenheit von PI-PLC bei 37°C unterzogen. Die wäßrigen Phasen wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Proteine mit Streptavidin nachgewiesen.

Es konnten auf diese Weise sieben Proteine mit Molekulargewichten von 22, 26, 35, 60, und 94 kDa nach der PI-PLC Behandlung in der wäßrigen Phase identifiziert werden (Abb. 23). Eine Ausnahme bildet das 26-kDa Protein, da es auch ohne PI-PLC-Behandlung in der wäßrigen Phase gefunden wurde. Eine der Ursachen für die Freisetzung dieses Proteins könnte an Spuren von Triton X-114 in der wäßrigen Phase liegen, die zur Solubilisierung schwach hydrophober Proteine ausreichen. Weitere Ursachen könnten auch proteolytische Degradation oder endogene PI-PLC Aktivität sein (Lisanti *et al.*, 1988).

Mit Ausnahme des 26-kDa Proteins handelt es sich also bei den anderen Proteinen um spezifische Freisetzungen durch die PI-Phospholipase-Aktivität. Die Triton X-100-unlösliche Plasmamembran-Subfraktion aus Pflanzen enthält demnach GPI-verankerte Proteine.

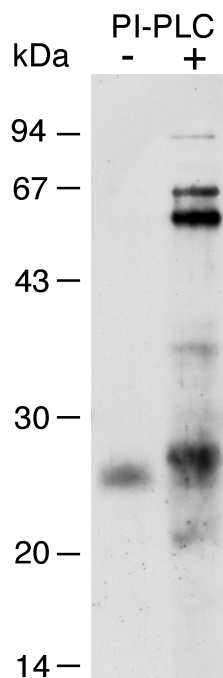


Abbildung 23. Identifizierung GPI-verankerter Proteine in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion. Biotin-markierte Proteine aus Triton X-100-unlöslichen Fraktionen wurden in Gegenwart (+) oder in Abwesenheit (-) von PI-PLC mit Triton X-114 extrahiert. Die in die wäßrige Phase übergegangenen Proteine wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Hybond-P Membran übertragen. Nach der Inkubation mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat wurden die Proteine durch Chemolumineszenz-Reaktion nachgewiesen.

5. Funktionelle Analyse von G β

Zur Analyse der Funktion heterotrimerer G-Proteine in höheren Pflanzen wurde das G β -Gen als „antisense“ RNA in Tabakpflanzen exprimiert. Die „antisense“-Methode wird oft zur Untersuchung der Genexpression in Eukaryonten benutzt. Hierbei reguliert die „antisense“-RNA die Genexpression auf unterschiedlichen Ebenen, z.B. durch Verzögerung der Transkription, Regulation des RNA-Spleißens, Hemmung des RNA-Exports aus dem Zellkern, Hemmung der Translation oder Verminderung der RNA-Stabilität.

5.1. Phänotyp der G β -„antisense“-Pflanzen und Nachweis der Transgenität

Nach der Transformation der G β -„antisense“-Konstruktion in Tabak wurden 30 unabhängige Transformanten, A1 – A30 (T₀-Generation) auf Kanamycin-Medium regeneriert und bis zur Samenreife im Gewächshaus angezogen. Die T₁-Keimlinge von 27 transgenen Pflanzen zeigten Kanamycin-Resistenz (Km^r) während die Keimlinge zweier Linien (A28 und A29) nach der Entwicklung der Kotyledonen abstarben.

Die Pflanzen der T₀-Generation sowie die Keimlinge der T₁-Generation zeigten keine phänotypische Ausprägung im Vergleich zum Wildtyp. Eine Pflanze der T₀-Generation (A30) produzierte jedoch keine Samen.

Die Integration der „antisense“-Konstruktion ins Tabak-Genom wurde bei den T₁-Keimlingen zusätzlich mit Hilfe der PCR unter Verwendung G β -spezifischer Oligonukleotide nachgewiesen (Abb. 24). Bei der PCR mit genomischer DNA der transformierten Pflanzen als Matritze sind zwei Produkte unterschiedlicher Größe zu erwarten. Das größere Produkt entsteht durch die Amplifikation der genomischen, intronhaltigen G β -Sequenz, das kleinere durch die Amplifikation der cDNA aus der „antisense“-Konstruktion. 27 Linien haben das „antisense“-Konstruktion stabil ins Genom integriert. Der Nachweis der Transgenität für die Linien, die auf Grund ihrer reduzierten G β Proteinmenge weiter untersucht wurden, ist in Abbildung 25 dargestellt.

Die Linien A9, A10, A11, und A13 wurden mit den Oligonukleotiden G β f und G β 3'1 analysiert (Abb. 25A). Es zeigte sich, daß sowohl der Wildtyp als auch die „antisense“-Linien ein 1,6 kBp-Fragment aufweisen, das der intronhaltigen G β Sequenz entspricht. Bei den „antisense“-Linien ist zusätzlich ein 840 Bp großes Fragment zu beobachten, das durch Amplifikation der cDNA der „antisense“-Konstruktion entsteht.

Die Linien A15, A28 und A29 wurden mit den Oligonukleotiden G β f und β -G untersucht (Abb. 25B). Dabei erwartet man bei erfolgreicher Transformation das Auftreten eines 210 Bp großen Fragments, wie bei der Linie A15 zu beobachten ist. Beim Wildtyp und bei den Linien A28 und A29, die keine Kanamycin-Resistenz gezeigt haben, wurde nur ein größeres Fragment amplifiziert.

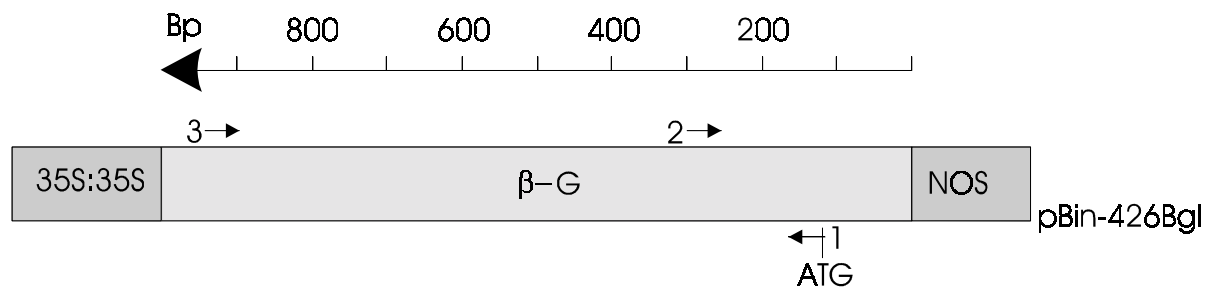


Abbildung 24. Die G β -„antisense“ Konstruktion mit den gekennzeichneten Oligonukleotiden G β f (1), β -G (2) und G β 3'1 (3).

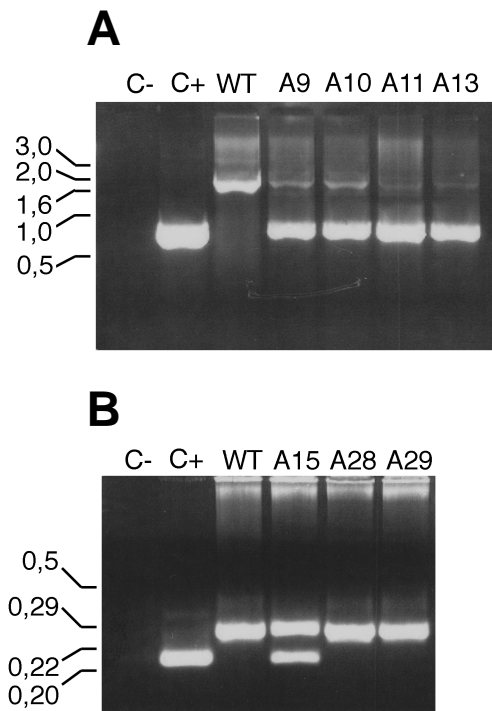


Abbildung 25. Nachweis stabiler Transformanten. Die PCR erfolgte mit den Oligonukleotiden G β f und G β 3'1 (A) bzw. G β f und β -G (B). Die genomische DNA wurde aus Wildtyp *N. tabacum* (WT), sowie aus den „antisense“-Linien A9, A10, A11 und A13 (A) bzw. A15, A28 und A29 (B) isoliert. Als positive Kontrolle (C+) diente G β -cDNA, als negative Kontrolle (C-) ein Reaktionsansatz ohne DNA. Die Agarosegele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt.

5.2. Nachweis von G β in transgenem Tabak durch Antikörper

Die Expression einer „antisense“ RNA in transgenen Pflanzen sollte zu einer Senkung des entsprechenden Translationsprodukts führen. Um zu überprüfen, ob die G β -„antisense“ Pflanzen diesen Effekt zeigen, wurden Mikrosomen aus den Blättern der T₁-Keimlinge isoliert und mit anti-G β Antikörpern analysiert. Die Keimlinge von 18 der 27 transformierten Linien zeigten keinen Unterschied in der Menge von G β im Vergleich zum Wildtyp. Bei fünf Linien war G β um weniger als 25% reduziert (Daten nicht gezeigt). Die T₁-Keimlinge der Linien A9, A10, A11 und A15 zeigten eine Reduktion zwischen 25 und 50% (Abb. 26A).

Eine niedrigere Menge an G β in Vergleich zum Wildtyp konnte man auch in Wurzeln nachweisen, die Linie A15 zeigte jedoch in diesem Fall keine Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 26B). T₁-Keimlinge haben trotz der deutlichen Reduzierung der Menge an G β keine phänotypischen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp gezeigt.

Für die Linien A10 und A15 wurde die T₂-Generation generiert, um zu untersuchen, ob die Menge an G β möglicherweise in der T₂-Generation noch weiter vermindert ist und die Pflanzen dadurch eine sichtbare phänotypische Ausprägung zeigen. Dazu wurden zehn T₁-Pflanzen der Linie A10 und fünf T₁-Pflanzen der Linie A15 bis zur Samenreife kultiviert, die Samen gesammelt und die T₂-Keimlinge auf den Gehalt an G β untersucht.

Die unter Langtag Bedingungen kultivierten T₂-Keimlinge unterschieden sich, genau wie die T₁-Generation, nicht vom Wildtyp. Die *Western*-Analyse der Mikrosomen aus Blättern zeigte, daß keine der untersuchten T₂-Keimlinge der Linie A10 (A10-1 bis A10-10) im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Menge an G β aufwies (z.B. A10-5, Abb. 27). Bei der Linie A15 wurde dagegen in zwei von fünf untersuchten T₁-Pflanzen auch in der T₂-Generation eine reduzierte Menge an G β beobachtet (Abb. 27, A15-4 und A15-6). Bei der Linie A15-6 war die Menge an G β um 75% reduziert, sie wurde deshalb für weitere Untersuchungen verwendet.

Bei der Analyse der T₁ und T₂ Generation wurde zusätzlich beobachtet, daß die „antisense“-Linien, die eine reduzierte Menge an G β enthalten, auch eine geringere Menge Samen produzieren. Bei zwei Linien, A10 und A15-4 wurde beobachtet, daß ca. 50% der ausgesäten Samen nicht keimen.

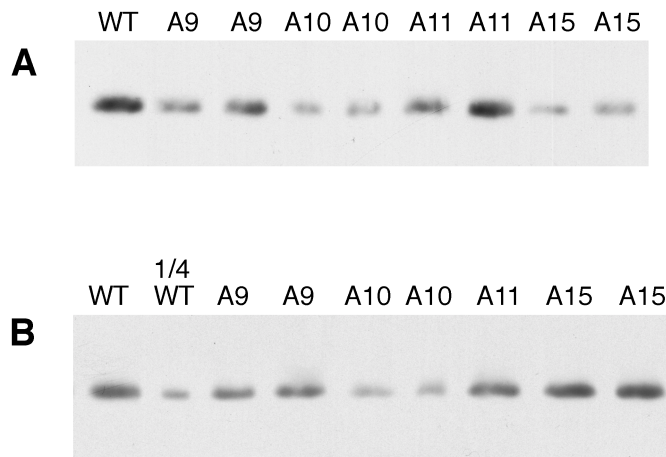


Abbildung 26. Die Analyse der T₁-Generation auf Gβ Proteinmenge in Blättern (**A**) und Wurzeln (**B**). Die Mikrosomen wurden aus Keimlingen der „antisense“-Linien A9, A10, A11 und A15, sowie aus dem Wildtyp (WT) isoliert. Gleiche Proteinmengen wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit den anti-Gβ Antikörpern analysiert.

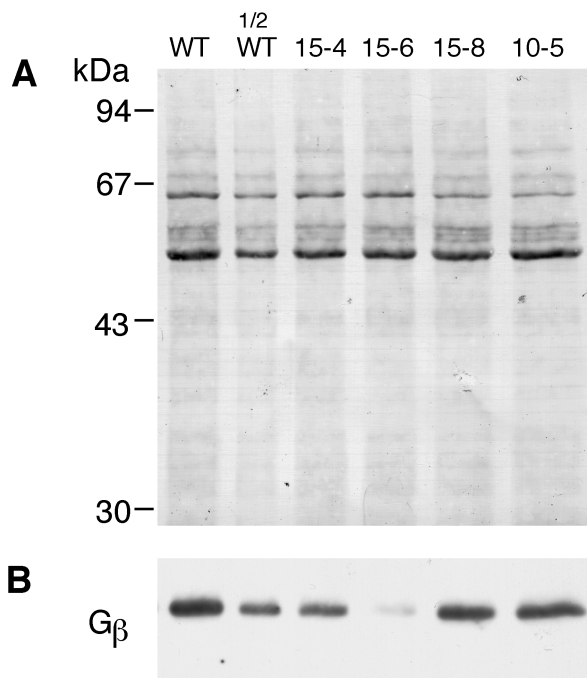


Abbildung 27. Die Analyse der T₂-Generation auf Gβ Proteinmenge in Blättern. Mikrosomen wurden aus Keimlingen der „antisense“-Linien 15-4, 15-6, 15-8 und 10-5, sowie aus dem Wildtyp (WT) isoliert. Gleiche Proteinmengen wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (**A**) und mit den anti-Gβ Antikörpern analysiert (**B**).

5.3. Chlorophyllgehalt und Chlorophyll-Fluoreszenz während der Ergrünung

Wie oben gezeigt wurde, unterscheiden sich die G β -„antisense“ Pflanzen unter normalen, physiologischen Bedingungen nicht vom Wildtyp. Da jedoch eine Beteiligung heterotrimerer G-Proteine bei der Lichtsignalkette vermutet wird, ist anzunehmen, daß während der Ergrünungsphase Unterschiede in der Entwicklung zu beobachten sind.

4 h Licht	Chl	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>
WT	0,006000	0,0077	----	----
15-8	0,006095	0,0078	----	----
15-4	0,002916	0,0037	----	----
15-6	0,002467	0,0037	----	----
8 h Licht	Chl	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>
WT	0,038	0,039	----	----
15-8	0,035	0,036	----	----
15-4	0,041	0,040	----	----
15-6	0,025	0,028	----	----
16 h Licht	Chl	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>
WT	0,103	0,038	0,0014	27,1
15-8	0,088	0,032	0,0018	17,7
15-4	0,108	0,039	0,0020	19,5
15-6	0,085	0,031	0,0009	34,4
24 h Licht	Chl	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>
WT	0,174	0,058	0,0086	6,7
15-8	0,190	0,063	0,0105	6,0
15-4	0,200	0,066	0,0113	5,8
15-6	0,189	0,061	0,0116	5,2

Tabelle 2. Der Chlorophyllgehalt der „antisense“-Linien 15-4, 15-6 und 15-8 im Vergleich zum Wildtyp (WT) während der Ergrünung, in mg Chlorophyll pro g Frischgewicht.

Keimlinge von Wildtyppflanzen bzw. von den „antisense“-Linien A15-8 (G β Proteinmenge vergleichbar mit dem Wildtyp), A15-4 (50% reduzierte G β Proteinmenge) und A15-6 (75% reduzierte G β Proteinmenge) wurden für 10 bis 12 Tage im Dunkeln angezogen und dann für 24 h ins Licht gestellt. In regelmäßigen Abständen wurde der Chlorophyllgehalt gemessen (Tabelle 2).

Nach 16 h oder 24 h Licht war der Chlorophyllgehalt der verschiedenen „antisense“-Linien und des Wildtyps gleich, Unterschiede zeigten sich nur innerhalb weniger Stunden nach Beginn der Lichtinkubation.

Bei der Linie A15-6 konnte in der frühen Phase der Ergrünung (nach 4 h bzw. 8 h Licht) eine Reduktion des Chlorophyllgehalts im Vergleich zum Wildtyp und zur Linie A15-8 beobachtet werden. Nach 16 h zeigte sie außerdem ein höheres Chlorophyll *a/b* Verhältnis.

Der Chlorophyllgehalt der Linie A15-4 war bereits nach 8 h Belichtung vergleichbar mit dem des Wildtyps.

6 h Licht	$\Phi\Pi$	F_v/F_m	qP	qN
WT	0,22	0,294	0,8	0,4
10-5	0,27	0,374	0,9	0,42
15-6	0,14	0,212	0,5	0,44
11 h Licht	$\Phi\Pi$	F_v/F_m	qP	qN
WT	0,47	0,598	0,8	0,27
10-5	0,46	0,628	0,9	0,3
15-6	0,38	0,510	0,8	0,3
16 h Licht	$\Phi\Pi$	F_v/F_m	qP	qN
WT	0,58	0,720	0,9	0,23
10-5	0,56	0,746	0,85	0,34
15-6	0,46	0,617	0,8	0,25

Tabelle 3. Spektroskopische Parameter* der Chlorophyll-Fluoreszenz der „antisense“-Linien 15-6 und 10-5 bzw. des Wildtyps.

*Für die Beschreibung der Parameter siehe Methoden.

Bei der Linie A15-6 sind offenbar die Prozesse verlangsamt, die während der Ergrünung zur Entwicklung funktioneller Chloroplasten führen. Da eine Analyse der lichtregulierten Komponenten des Photosyntheseapparates auf Transkriptions- oder Translations-Ebene wegen der limitierten Samenproduktion der Linie A15-6 nicht möglich war, wurden die Pflanzen mit Hilfe der Chlorophyll *a*-Fluoreszenz untersucht.

Die Chlorophyll *a*-Fluoreszenz wird oft als ein Indikator der Photosynthesereaktionen benutzt, sie wird bei Raumtemperatur *in vivo* vor allem von den Pigmenten des PS II verursacht (Krause und Weis, 1991). Nach Belichtung eines dunkeladaptierten Blattes wird ein charakteristischer Kurvenverlauf beobachtet (Kautsky-Effekt), aus dem die Fluoreszenzausbeute F_v/F_m (maximale Quantenausbeute) und die effektive Quantenausbeute des Photosystems II (Φ_{II}) ermittelt werden. Die Fluoreszenzausbeute F_v/F_m reflektiert die Effizienz der primären photosynthetischen Abläufe in PS II. Die Löschmechanismen der Fluoreszenz im belichteten Zustand reflektieren die Funktionalität des photosynthetischen Elektronentransports, des PS I, der ATPase und des Calvin-Cyklus, sie setzen sich aus den photochemischen (qP) und nicht photochemischen (qN) Ereignissen zusammen.

Die Untersuchung der Chlorophyllfluoreszenz wurde mit der Linie A15-6 durchgeführt. Als Kontrolle diente der Wildtyp sowie die Linie A10-5, die eine mit dem Wildtyp vergleichbare Menge an G β enthält. Die Messungen wurden nach einer 6-stündigen Lichtinkubation durchgeführt, da erst zu diesem Zeitpunkt ein charakteristischer Kurvenverlauf der Fluoreszenz beobachtet wurde. Weitere Messungen erfolgten nach 16 h bzw. 24 h Licht (Tabelle 3).

Die Linie A15-6 zeigte bei allen drei Zeitpunkten ein niedrigeres F_v/F_m Verhältnis und eine geringere Quantenausbeute Φ_{II} als die Kontrollpflanzen. Φ_{II} ist nach 6 h Licht um 37% reduziert, nach 16 h bzw. 24 h Licht um 20%. Das weist darauf hin, daß in der „antisense“-Linie A15-6 das Photosystem II weniger effizient arbeitet als in den Kontrollpflanzen.

Die Werte für qP und qN blieben dagegen bei allen untersuchten Pflanzen etwa gleich.

D. DISKUSSION

1. Die Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine in höheren Pflanzen

Die α -Untereinheit aus Tabak ist zwischen 35% und 40% zu den verschiedenen α -Untereinheiten der Säugetiere identisch (Abb. 2). Die höchste Homologie besteht im Bereich der ersten vier GTP-Bindemotive (G1 bis G4) sowie in den Regionen, die für die Wechselwirkung mit der β -Untereinheit verantwortlich sind. Dagegen ist das G5-Motiv am C-Terminus zwar in pflanzlichen α -Untereinheiten hoch konserviert, unterscheidet sich aber von α -Untereinheiten aus anderen Eukaryonten. Dies könnte bedeuten, daß sich die enzymatischen Eigenschaften der pflanzlichen α -Untereinheiten von denen der tierischen unterscheiden. Für die α -Untereinheit aus Reis wurde beispielsweise gezeigt, daß die GTP-Bindung im Gegensatz zu den meisten eukaryontischen α -Untereinheiten unabhängig von Mg^{2+} -Ionen erfolgt (Iwasaki *et al.* 1997).

Die β -Untereinheit aus Tabak zeigt die höchste Homologie zu β -Untereinheiten aus anderen Eukaryonten in der Region der WD-Motive (Abb. 3), die bei Transducin eine β -Propeller-Struktur ausbildet (Sondek *et al.*, 1996). Die Aminosäuren, die die Wechselwirkungen innerhalb des β -Propellers ermöglichen, sind bei Tabak konserviert und weisen auf eine Transducin-ähnliche Struktur hin.

Die Aminosäuren, die an der Interaktion zwischen der β -Untereinheit und der α - bzw. γ -Untereinheit beteiligt sind, liegen bei Transducin ebenfalls in der Region des β -Propellers (Lambright *et al.*, 1996). Auch diese Aminosäuren sind bei Tabak konserviert. Dies weist einerseits darauf hin, daß der Kontakt zwischen der α - und der β -Untereinheit bei höheren Pflanzen auf ähnliche Weise wie bei Säugetieren stattfindet, andererseits zeigt dies, daß die Voraussetzungen für die Interaktion mit der potentiellen γ -Untereinheit am C-Terminus gegeben sind. Weiterhin geht aus der Strukturvorhersage der β -Untereinheit aus Tabak hervor, daß am N-Terminus eine „coiled coil“ Struktur ausgebildet werden könnte.

Aufgrund dieser Sequenzähnlichkeiten mit den β -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine aus Säugetieren ist es wahrscheinlich, daß auch in Pflanzen mindestens eine γ -Untereinheit existiert.

2. Subzelluläre Lokalisation und mögliche Funktion des G β

Die β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine in Tabakblättern ist in der Plasmamembran und in der Zellkernfraktion lokalisiert (siehe Abb. 5 - 9). Es ist aus Säugetieren bekannt, daß die heterotrimeren G-Proteine meistens mit der Plasmamembran assoziiert sind, während die einzelnen Untereinheiten auch in anderen Zellfraktionen nachgewiesen werden können, wie z.B. in Pinocytosevesikeln, in der Mitosespindel und im Golgi Apparat (Pennington, 1994).

Bei Pflanzen wurden die einzelnen Untereinheiten zusätzlich in der ER-Fraktion gefunden. Weiss *et al.* (1997) beispielsweise zeigten, daß die α -Untereinheit in meristematischen Zellen von *Arabidopsis* und Blumenkohl mit der Plasmamembran und dem ER assoziiert ist. Die β -Untereinheit im Endosperm und im Embryo aus Tabak wurde ebenfalls im ER nachgewiesen (Kaydamov *et al.*, 2000). Es ist jedoch möglich, daß die heterotrimeren G-Proteine bei Pflanzen in unterschiedlichen Geweben in verschiedenen Fraktionen lokalisiert sind. Andererseits können die Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine eine unterschiedliche Verteilung innerhalb einer Zelle haben. So sind z.B. die α -Untereinheiten der G-Proteine G_o, G_s und G_{q/11} mit den Membranen des Golgi Apparates assoziiert, während die β -Untereinheiten in dieser Fraktion nicht nachgewiesen werden konnten (Schurman *et al.*, 1992; Meier *et al.*, 1995; Denker *et al.*, 1996).

Die größte Menge an G β wurde in der Plasmamembranfraktion von jungen, noch im Wachstum begriffenen Blättern nachgewiesen, während die Menge in älteren Blättern niedriger ist (Abb. 10). Das weist darauf hin, daß das mit der Plasmamembran assoziierte G β -Protein eine Rolle bei der Signalübertragung während der Blattentwicklung spielt.

Bei dem auslösenden Signal könnte es sich um Licht oder um Phytohormone handeln. In *Arabidopsis* wurde ein Protein mit Homologie zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren identifiziert (Josefsson und Rask, 1997). Plakidou-Dymock *et al.* (1998) zeigten, daß transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die eine „antisense“ RNA dieses Rezeptors überexprimieren, eine reduzierte Sensitivität für Cytokinine haben, was darauf hinweist, daß diese Phytohormone durch G-Protein-gekoppelte Signalübertragung wirken.

Andererseits könnten die heterotrimeren G-Proteine in der Plasmamembran durch Licht aktiviert werden. Bisher identifizierte Photorezeptoren sind jedoch meistens nicht mit der Plasmamembran assoziiert (Lin *et al.*, 1996; Elich und Chory, 1997; Kleiner *et al.*, 1999). Es ist nicht bekannt, ob in diesem Fall eine Signalübertragung zur Plasmamembran und eine

Aktivierung heterotrimerer G-Proteine stattfindet. Der Signalweg würde sich in diesem Fall von dem Weg unterscheiden, der über extrazelluläre Signale verläuft. Die Photorezeptoren könnten dabei direkt oder *via* Intermediate heterotrimere G-Proteine aktivieren, was eine neue Art der Signalübertragung darstellen würde, die bisher bei Säugetieren unbekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß sich ein signifikanter Anteil an G β im Zellkern befindet oder mit dem Zellkern assoziiert ist (Abb. 6). Die G β -Proteinsequenz enthält keine offensichtliche Kernlokalisationssequenz, möglicherweise wird die Untereinheit zusammen mit einem anderen Protein transportiert. GTP-bindende Proteine wurden in Zellkernfraktionen von Säugetierzellen und von Pflanzen gefunden, aber ihre Funktion ist weitgehend unbekannt. Takei *et al.* (1994) wiesen darauf hin, daß ein Pertussis-Toxin-sensitives GTP-bindendes Protein in Zellkernen aus Rattenleberzellen eine Funktion beim Proteintransport in den Zellkern haben könnte. Mehrere GTP-bindende Proteine, einschließlich G α , wurden in membranfreien Zellkernen aus Karottenzellen nachgewiesen (Drøbak *et al.*, 1995), während Clark *et al.* (1993) zeigten, daß die mit der Kernhülle assoziierte GTPase-Aktivität bei Erbse durch den Photorezeptor Phytochrom reguliert ist.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die kernlokalisierten heterotrimeren G-Proteine in frühen Prozessen der Licht-Signalübertragung involviert sind. Die Phytochrome A und B, die bis vor kurzem nur als cytoplasmatische Proteine angesehen waren, werden in einer lichtregulierten Weise in den Zellkern transportiert (Sakamoto und Nagatani, 1996; Kircher *et al.*, 1999). Dies weist darauf hin, daß sie im Zellkern eine Signalkette auslösen können.

Die Analyse der G β -„antisense“-Pflanzen

Um die Funktion des potentiellen $\beta\gamma$ -Komplexes in höheren Pflanzen zu untersuchen, wurden transgene Tabakpflanzen hergestellt, die „antisense“-RNA für G β überexprimieren. Die Menge an G β -Protein wurde bei verschiedenen „antisense“-Linien um 25 – 75% reduziert, trotzdem waren die Pflanzen unter Langtag Bedingungen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. G α -„antisense“-Linien in Reis zeigen dagegen eine abnormale Morphologie (Fujisawa *et al.* 1999). Die Pflanzen haben kürzere Internodien als der Wildtyp (Zwergwuchs-Charakteristiken) und produzieren kleinere Samen, die Blätter sind jedoch grün. Aufgrund dieser Daten wurde eine Beteiligung der α -Untereinheit an der Regulation von Wachstum und Zellteilung postuliert, die möglicherweise durch das Phytohormon Gibberelin vermittelt wird.

Die α - und β -Untereinheiten könnten also bei höheren Pflanzen an unterschiedlichen Prozessen beteiligt sein. Die Tatsache, daß die G β -, „antisense“-Tabaklinien (diese Arbeit) sowie G α -, „antisense“-Reislinien (Fujisawa, 1999) eine normale Photomorphogenese zeigen, weist darauf hin, daß die Signalkette in diesem Fall nicht über bisher bekannte heterotrimere G-Proteine verläuft.

Die Samenproduktion und die Keimrate ist bei G β -, „antisense“-Pflanzen beeinträchtigt, was auf eine Funktion des $\beta\gamma$ -Komplexes bei der Samenreifung hindeutet. Diese Vermutung wird durch Analysen der G β -Genexpression während der somatischen Embryogenese bei *N. plumbaginifolia* bestätigt, die zeigen, daß die G β -mRNA in späten Stadien der Embryoentwicklung in größeren Mengen vorkommt (Kaydamov *et al.* 2000). Jones *et al.* (1998) postulierten weiterhin, daß die heterotrimeren G-Proteine eine durch Gibberelin induzierte Expression der α -Amylase im Aleuron von Hafer regulieren und damit die Nutzung der Samenreserven ermöglichen.

Die im Dunkeln angezogenen Keimlinge der G β „antisense“-Linien A15-4 und A15-6 zeigten nach der Lichtinkubation eine langsamere Chlorophyllsynthese und einen langsameren Aufbau des Photosyntheseapparates als der Wildtyp (Siehe Tabelle 2 und 3). Dies bedeutet, daß einige Komponenten des Photosyntheseapparates fehlen oder weniger effizient exprimiert werden. Der Effekt wurde allerdings nur in der frühen Ergrünungsphase beobachtet, danach entwickeln sich die Keimlinge wie der Wildtyp. Der putative $\beta\gamma$ -Komplex ist in diesem Falle also ein positiver Regulator dieser Entwicklungsprozesse.

Beim Wildtyp ist die Menge an G β in Kotyledonen insgesamt niedriger als in Blättern, weshalb der Effekt einer reduzierten G β -Konzentration in der frühen Entwicklungsphase deutlicher ausgeprägt ist. Die Ursache für diesen schwachen Effekt könnte darin bestehen, daß eine geringe Menge aktiven Proteins für eine Signalübertragung ausreicht. Es ist andererseits möglich, daß beide funktionellen Untereinheiten, die α -Untereinheit und der $\beta\gamma$ -Komplex, diese Prozesse regulieren, wobei die α -Untereinheit das Fehlen eines funktionellen $\beta\gamma$ -Komplexes kompensiert und dadurch ebenfalls als positiver Regulator wirkt. Die Rolle der α -Untereinheit als positiver Regulator wird in Experimenten gezeigt, in denen eine Aktivierung der G-Proteine durch GTP und Cholera-Toxin zu einer Aktivierung der Expression von Genen

führt, die bei der Chloroplastenentwicklung beteiligt sind (Romero und Lam, 1993; Neuhaus *et al.*, 1993).

Die Experimente mit den G β -„antisense“ Pflanzen bestätigten also die Vermutung, daß heterotrimere G-Proteine die Expression von Chloroplastenproteinen regulieren. Das Signal wird über den $\beta\gamma$ -Komplex weitergeleitet, wobei eine Funktion der α -Untereinheit nicht ausgeschlossen werden kann. Was aber ist der Auslöser dieses Signals?

Mehrere Studien zeigten, daß das Phytohormon Cytokinin einen Einfluß auf die Expression und die posttranskriptionelle Regulation kernkodierter Chloroplastenproteine hat (Flores und Tobin, 1986; Chory *et al.*, 1994; Kusnetsov *et al.*, 1994). Die posttranskriptionelle und posttranslationelle Regulation ist wichtig für die Anhäufung und Stabilität kernkodierter Tylakoidproteine während der Ergrünung bei Tabak (Palomeras *et al.*, 1993). Eine verzögerte Ergrünung, wie sie bei den G β -„antisense“ Keimlingen beobachtet wurde, könnte also durch eine Störung in der Signalübertragung vom Cytokinin auf den $\beta\gamma$ -Komplex hervorgerufen werden.

Ein weiterer möglicher Auslöser ist das Licht. Obwohl die heterotrimeren G-Proteine meiner Meinung nach keine Schlüsselrolle bei der Induktion der Photomorphogenese spielen, kann ihre Beteiligung an der lichtinduzierten Genexpression in einzelnen Fällen nicht ausgeschlossen werden. Diese Signalübertragung könnte im Zellkern oder an der Plasmamembran ablaufen. Warpeha *et al.* (1991) zeigten beispielsweise, daß ein gegenüber Cholera- bzw. Pertussis-Toxin sensitives G-Protein in der Plasmamembran durch Blaulicht aktiviert werden kann.

In einem Modell wird vorgestellt, wie verschiedene Faktoren die Expression von Chloroplastenproteinen während der Ergrünung regulieren könnten (Abb. 28).

Im Dunkeln aktiviert das Phytohormon die Signalkette, die Genexpression wird aber durch Repressoren inhibiert. Die Chloroplastenproteine sind nur schwach exprimiert. Hinweise für die Repression der Entwicklung höherer Pflanzen im Dunkeln liefern Analysen von Mutanten, die eine Photomorphogenese im Dunkeln zeigen (McNellis und Deng, 1995; von Arnim und Deng, 1996). Die Zerstörung funktioneller Chloroplasten führt ebenfalls zu einer Inhibierung der Genexpression (Oelmüller, 1989).

Das Licht beeinflusst auf unterschiedliche Weise die G-Protein-gekoppelte Signalübertragung. Zum einen deaktiviert es den Dunkel-Repressor, zum anderen hat es zusammen mit dem G-

Protein-gekoppelten Signalweg einen Einfluß auf die Genexpression. Während der Plastidenentwicklung wird der Plastidenrepressor deaktiviert. Reife Chloroplasten können über das Plastidensignal die Genexpression im Zellkern modulieren.

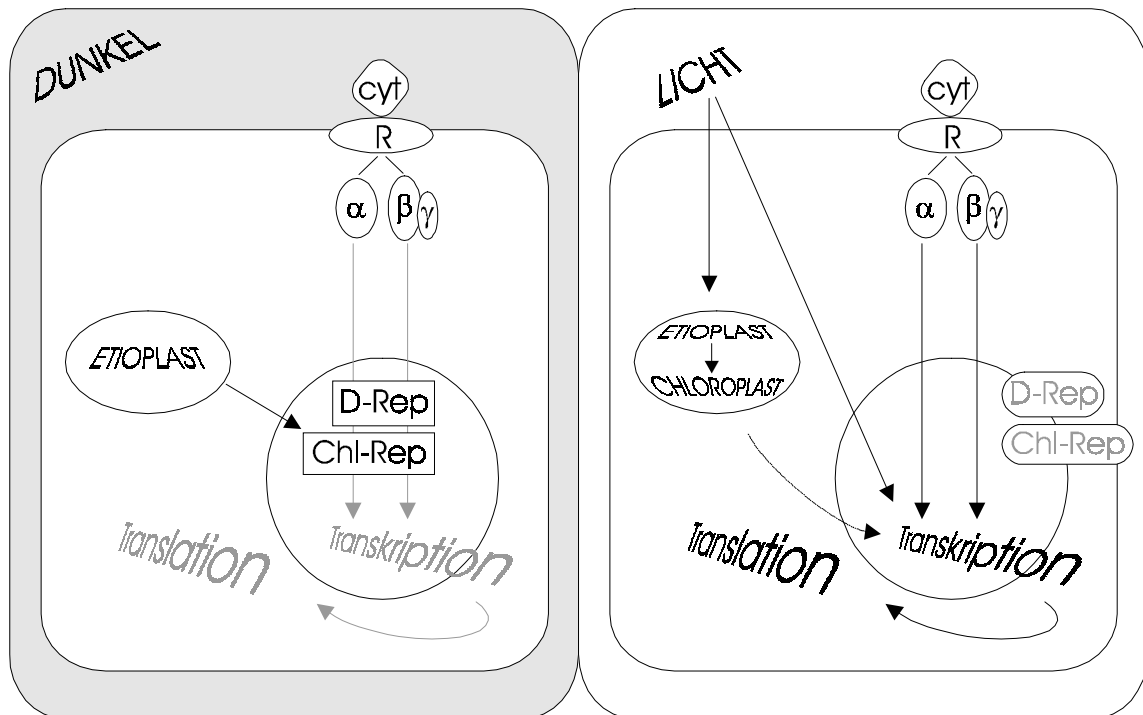


Abbildung 28. Regulation der Chloroplastenproteine während der Ergrünung. CYT, Cytokinin; R, Rezeptor; $\alpha\beta\gamma$, heterotrimeres G-Protein; D-Rep, Dunkel-Repressor; Chl-Rep, Plastidenrepressor.

3. Biochemische Eigenschaften der heterotrimeren G-Proteine höherer Pflanzen

3.1. Assoziation des G β -Proteins mit der Plasmamembran

Die Untersuchung der Assoziation des G β -Proteins mit der Plasmamembran ergab, daß es durch hydrophobe Wechselwirkungen verankert ist (Abb. 13). G β kann weder durch hohe Ionenstärke (1 M NaCl) noch durch alkalische Lösungen (0,1 M NaCO₃, pH 11,0) aus der Membran extrahiert werden. Dies weist auf eine starke hydrophobe Interaktion hin, was durch Extraktionen der Membranen mit 3 M Harnstoff und mit Detergenzien bestätigt wird.

G β selbst besitzt aufgrund von Strukturvorhersagen keine transmembranen Domänen (siehe Abb. 14), die Verankerung in der Membran könnte durch einen Lipidanker oder durch Wechselwirkung mit einem anderen Protein erfolgen.

Die Proteinsequenz von G β aus Tabak läßt zwar wie die β -Untereinheiten aus anderen Eukaryonten mehrere Myristoylierungsmotive erkennen, trotzdem gibt es bisher keinen Beweis für eine solche Modifikation. Selbst wenn G β durch Myristoylgruppen in der Membran verankert sein sollte, wären noch andere Wechselwirkungen (ionische Interaktionen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen) notwendig, um die beobachtete Stärke der Membranverankerung zu ermöglichen (Wedegaertner *et al.*, 1995). Da ionische Interaktionen unwahrscheinlich sind, wie durch die Ergebnisse der Waschungen gezeigt wurde, ist zu vermuten, daß die Membranverankerung auf Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht. Diese Wechselwirkung könnte z.B. durch Ausbildung der „coiled coil“ Struktur zwischen G β und G γ erfolgen, wie sie im tierischen System nachgewiesen ist, welche nur unter denaturierenden Bedingungen gelöst werden kann (Sondek *et al.*, 1996). Die γ -Untereinheit ist oft mit Geranylgeranyl modifiziert, was eine stabile, von anderen Proteinen unabhängige Verankerung in der Membran erlaubt (Wedegaertner *et al.*, 1995). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, daß die β -Untereinheit aus Tabak über ein G γ ähnliches Protein in der Membran verankert ist.

Eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit, die die Bedeutung der potentiellen „coiled coil“ Struktur bei der Verankerung einer β -Untereinheit aus höheren Pflanzen unterstreicht, stützt diese Vermutung (Obrdlik *et al.*, 2000). Die Voraussetzung für die Isoprenylierung einer potentiellen γ -Untereinheit in höheren Pflanzen ist gegeben, da Tabak über eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat spezifische Prenyl:Protein-Transferase verfügt (Randall *et al.*, 1993).

3.2. Die native Form des G β -Proteins in der Plasmamembran

Die native Form heterotrimerer G-Proteine in der Plasmamembran wurde mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese sowie der Gelfiltrations-Chromatographie untersucht. Nach Solubilisierung mit Cholat konnte G β in der Gelfiltrations-Chromatographie überwiegend als Komponente eines 120-kDa großen Proteins nachgewiesen werden, was der Größe eines

heterotrimeren G-Proteins bei Säugetieren entspricht. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß auch in Pflanzen eine γ -Untereinheit existiert.

Ein kleiner Teil des $G\beta$ Proteins wird als ein ca. 630-kDa großer Proteinkomplex eluiert. Werden die Membranen jedoch mit Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiert, findet sich $G\beta$ ausschließlich in dem 630-kDa großen Komplex. Versuche mit nativer Gelelektrophorese bestätigen, daß $G\beta$ in der Tabak-Plasmamembran als ein multimerer Proteinkomplex existiert. Aufgrund von Daten aus tierischen Systemen wurde postuliert, daß mehrere heterotrimere G-Proteine mit einem Rezeptor einen übergeordneten Komplex ausbilden können. Nakamura und Rodbell (1990, 1991) zeigten beispielsweise, daß die heterotrimeren G-Proteine mit Octylglucosid oder Digitonin als große, multimere Komplexe extrahiert werden. Durch die Aktivierung mit Hormonen oder $GTP\gamma S$ werden daraus die Heterotrimere freigesetzt, die weiter in funktionelle Einheiten ($G\alpha$ und $G\beta\gamma$) dissoziieren können. Die Solubilisierung der Membranen mit Cholat oder Lubrol, die in der Regel für die Aufreinigung der heterotrimeren G-Proteine eingesetzt wurden, führt jedoch zur Isolierung der Proteine in Form der Heterotrimere.

Durch die Ausbildung der multimeren Komplexe könnte ein Rezeptor gleichzeitig mehrere heterotrimere G-Proteine aktivieren und somit verschiedene Signalwege regulieren (Jahangeer und Rodbell, 1993). Dieses Modell könnte erklären, wie ein Signal (z.B. Licht oder Phytohormone) bei Pflanzen verschiedene Prozesse in Gang setzen kann.

3.3. Triton X-100-unlösliche Mikrodomäne in der Plasmamembran höherer Pflanzen

In Plasmamembranen von Blattzellen finden sich mindestens zwei getrennte „pools“ des $G\beta$ -Proteins. Der eine läßt sich durch neutrale Detergenzien in Form multimerer Komplexe lösen (siehe oben), der andere ist mit Triton X-100-unlöslichen Plasmamembran-Mikrodomänen assoziiert. Die räumliche Trennung der heterotrimeren G-Proteine in der Plasmamembran könnte dafür sorgen, daß die Signalketten innerhalb einer Zelle spezifisch ablaufen.

Die Triton X-100-unlöslichen Membrandomänen aus Tabak lassen sich als eine flotierende Membranfraktion isolieren. Ihre spezifische Dichte ist etwas größer als die spezifische Dichte von Detergenz-unlöslichen, mit Glykolipiden angereicherten Membrandomänen aus Säugetierzellen. Dieser Unterschied könnte durch eine unterschiedliche

Lipidzusammensetzung der Membran begründet sein, oder durch ein anderes Lipid / Protein - Verhältnis hervorgerufen werden.

Biophysikalische Studien an künstlichen und biologischen Membranen unterstützen die Existenz der Mikrodomänen in der Plasmamembran (Brown und London, 1997; Ahmed *et al.*, 1997). Varma und Mayor (1998) zeigen durch *in vivo* Versuche, daß GPI-verankerte Folat-Rezeptoren in solchen Mikrodomänen auf der Zelloberfläche konzentriert sind, die einen Durchmesser von etwa 70 nm haben. Weitere Hinweise zur Größe und Dynamik der Lipid-Mikrodomänen *in vivo* stammen von Pralle *et al.* (2000). Sie zeigten, daß in der Plasmamembran Lipid-Mikrodomänen mit einem Durchmesser von 26 ± 13 nm existieren, die innerhalb der Membran mobil sind.

Die Größe der Mikrodomänen in Pflanzen entspricht in etwa der Größe von Caveolen, wie sie aus tierischen Zellen bekannt sind (Westermann *et al.*, 1999). Bei Pflanzen konnte jedoch Caveolin, ein Protein, das für die Struktur der Caveolen notwendig ist, nicht nachgewiesen werden.

Es ist nicht bekannt, ob höhere Pflanzen Caveolen besitzen. Die Clathrin-unabhängige Endocytose wurde bei Pflanzen noch nicht nachgewiesen, obwohl in einzelnen Fällen „Smooth pits“ und Vesikel beobachtet wurden (Low und Chandra, 1994). Die Caveolen sind aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften mit den Detergenz-unlöslichen Glycolipid-angereicherten Membrandomänen vergleichbar. Verbesserte Isolierungsprozeduren zeigten jedoch, daß sie nicht völlig gleich sind (Schnitzer *et al.*, 1995). Die Caveolen stellen eine spezielle Form der Lipid-Mikrodomänen dar, die bei vielen, aber nicht allen Säugetierzelltypen beobachtet wurde (Parton, 1996).

Die Proteinanalyse der Triton X-100-unlöslichen Membrandomänen aus Tabak zeigte, daß sich das Proteinmuster der spezifisch leichten Vesikel deutlich von der Proteinzusammensetzung der Plasmamembran unterscheidet. Der größte Teil der Plasmamembranproteine fehlt in den Triton X-100-unlöslichen Vesikeln, bestimmte Proteine sind dagegen stark angereichert. Sequenzanalysen sind zur Zeit im Gange, die zur Identifizierung der angereicherten Proteine der Triton X-100-unlöslichen Membrandomänen durchgeführt werden. Sie sollen dazu beitragen, die Funktion der Membrandomänen in Pflanzen zu klären.

In den Detergenz-unlöslichen Plasmamembrandomänen von Säugetieren ist eine Gruppe extrazellulärer Proteine angereichert, die mit Hilfe des Glycosylphosphatidylinosit (GPI) in der Membran verankert ist. Ihre Assoziation mit den Lipid-Mikrodomänen ist durch die lange, gesättigte Alkylkette des GPI-Ankers festgelegt (Benting *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sechs Proteine aus der Triton X-100-unlöslichen Fraktion von Tabakblättern GPI-verankerte Proteine sind. Aufgrund ihres Molekulargewichts scheinen fünf dieser Proteine ähnlich zu den GPI-verankerten Proteinen zu sein, die bereits an der Oberfläche von Tabakprotoplasten identifiziert wurden (Takos *et al.*, 1997). Auch andere Arbeiten bestätigen die Existenz GPI-verankerter Proteine an der Zelloberfläche von Pflanzen, deren Sequenz und Funktion jedoch meistens noch unbekannt sind (Morita *et al.*, 1996; Sherrier *et al.*, 1999). Für ein pflanzliches Membranprotein, das Arabinogalactan Protein, konnte die Struktur des GPI-Ankers bestimmt werden (Oxley und Bacic, 1999). Es handelt sich hier um einen GPI-Anker mit Ceramid als Lipidkomponente, dessen lange, gesättigte Alkylkette der entscheidende Faktor im Falle von Triton X-100-unlöslichen Membrandomänen höherer Pflanzen sein könnte.

Wie bereits oben erklärt wurde, ist G β aus Tabak durch starke hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran assoziiert. Es ist jedoch unklar, welche Faktoren ausschlaggebend für die Assoziation mit den Detergenz-unlöslichen Domänen sind. Auch in tierischen Systemen ist nicht bekannt, wie G-Proteine gezielt in verschiedene Mikrodomänen der Plasmamembran gelangen. Rehm und Ploegh (1997) zeigten, daß der im Cytoplasma synthetisierte G $\beta\gamma$ -Komplex direkt an der Plasmamembran mit den Detergenz-unlöslichen Membrandomänen assoziiert und dadurch selbst Detergenz-unlöslich wird, wofür der Isoprenoid-Anker der γ -Untereinheit notwendig ist. Andererseits kann der G $\beta\gamma$ -Komplex aus den Detergenz-unlöslichen Caveolen glatter Muskelzellen mit Triton X-100 solubilisiert werden (Smart *et al.*, 1995). Es scheint also, daß in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Faktoren, möglicherweise Proteine oder Lipide, für die spezifische Assoziation der G-Proteine verantwortlich sind.

Bei verschiedenen Zelltypen von Säugetieren sind in den Detergenz-unlöslichen Plasmamembran-Mikrodomänen die Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine angereichert (Chang *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1997). In Tabak konnte eine solche Anreicherung des G β nicht nachgewiesen werden. Das könnte einerseits bedeuten, daß

sich die Signalübertragung bei Pflanzen auch außerhalb der Detergenz-unlöslichen Mikrodomänen abspielt. Andererseits ist es möglich, daß die Detergenz-unlösliche Fraktion von Tabakblättern aus verschiedenen Subfraktionen besteht, von denen einige heterotrimere G-Proteine enthalten, andere dagegen nicht. Iwabuchi *et al.* (1998) konnten beispielsweise mit Hilfe spezifischer Antikörper zwei Membransubfraktionen in der spezifisch leichten, Detergenz-unlöslichen Fraktion identifizieren, die sich aufgrund ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden. Eine vergleichbare Fraktionierung bei höheren Pflanzen ist jedoch noch nicht möglich, da geeignete Marker fehlen.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Detergenz-unlösliche Mikrodomänen in pflanzlichen Plasmamembranen identifiziert und charakterisiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Komponenten der Signalketten höherer Pflanzen in Mikrodomänen organisiert sind. Ihre Untersuchung könnte dabei ein entscheidender Schritt zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der Signalübertragung in höheren Pflanzen sein.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Heterotrimere G-Proteine sind bei einer Vielzahl zellulärer Signalketten beteiligt, die extrazelluläre Signale über G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf Effektorproteine übertragen. In Pflanzen ist nur wenig über diesen Signalweg und dessen Funktion bekannt. Im Gegensatz zum tierischen System ist nur eine Klasse von Genen für die α - bzw. β -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine bekannt, eine γ -Untereinheit konnte noch nicht identifiziert werden. Es ist auch noch nicht geklärt, inwieweit die pflanzlichen Homologen in ihren Eigenschaften den heterotrimeren G-Proteinen anderer Eukaryonten ähnlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die biochemischen Eigenschaften und die Funktion der heterotrimeren G-Proteine in Tabak analysiert.

Mit Hilfe von Antikörpern gegen die β -Untereinheit ($G\beta$) eines heterotrimeren G-Proteins aus Tabak wurde die subzelluläre Lokalisation in Tabakblättern untersucht. Zellfraktionierungen zeigten, daß $G\beta$ überwiegend mit der Plasmamembran assoziiert ist, aber auch im Zellkern vorkommt. In jungen Blättern ist die Menge an $G\beta$ in der Plasmamembranen relativ hoch, während sie in späteren Stadien der Blattentwicklung deutlich abnimmt. Dies deutet auf eine Funktion der G-Proteine in Entwicklungsprozessen hin. Die Untersuchung von $G\beta$ -„antisense“-Pflanzen unterstützt diese Vermutung. Sie ergab erste Hinweise darauf, daß der putative $\beta\gamma$ -Komplex die Samenreifung und die Entwicklung von Chloroplasten beeinflusst.

$G\beta$ ist durch starke hydrophobe Wechselwirkungen mit der Plasmamembran assoziiert. Sequenzanalysen zeigten, daß $G\beta$ keine hydrophobe Domäne oder mögliche Lipid-Modifizierungsstellen besitzt, die diese starke Verankerung erklären könnten. Es wird deshalb postuliert, daß $G\beta$ über ein $G\gamma$ -ähnliches Protein in der Membran verankert ist.

$G\beta$ liegt in der Plasmamembran als ein hochmolekularer Komplex mit einer Größe von etwa 630 kDa vor. Es kann unter bestimmten Bedingungen aus diesem Komplex als ein Protein gelöst werden, dessen Größe von 120 kDa der heterotrimeren G-Proteine aus Säugetieren entspricht. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Existenz einer γ -Untereinheit in Pflanzen.

Eine Fraktion der heterotrimeren G-Proteine in Tabakblättern ist mit Detergenz-unlöslichen Plasmamembran-Mikrodomänen assoziiert. Diese Mikrodomänen, die hier zum ersten Mal in Pflanzen nachgewiesen wurden, sind aufgrund ihrer Ultrastruktur und biochemischen Eigenschaften den Caveolen aus Säugetierzellen ähnlich. Ihre Proteinzusammensetzung unterscheidet sich von derjenigen der sie umgebenden Plasmamembran dadurch, daß nur bestimmte Proteine darin angereichert sind. Sie enthalten beispielsweise GPI-verankerte Proteine, die spezifisch für Detergenz-unlösliche Membrandomänen von Säugetieren sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß die Komponenten der Signalketten bei Pflanzen in Plasmamembrandomänen organisiert sind. Weitere Untersuchungen dieser Domänen könnten ein wichtiger Schritt bei der Aufklärung der molekularen Grundlagen der Signalübertragung in höheren Pflanzen sein.

F. LITERATUR

Adamska I, Kloppstech K und Ohad I (1993) Early light-inducible protein in pea is stable during light stress, but is degraded during recovery at low light intensities. *J. Biol. Chem.* **268**, 5438-5444

Ahmed SN, Brown DA und London E (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid-phase in model membranes. *Biochemistry* **36**, 10944-10953

Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199-225

Angus CW, Van Meurs KP, Tsai SC, Adamik R, Miedel MC, Pan YC, Kung HF, Moss J und Vaughan M (1986) Identification of the probable site of cholera-catalyzed ADP-ribosylation in a G_o alpha-like protein based on cDNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5813-5816

Balcueva EA, Wang Q, Hughes H, Kunsch C, Yu Z und Robishaw JD (2000) Human G-protein γ_{11} and γ_{14} subtypes define a new functional subclass. *Exp. Cell Res.* **257**, 310-319

Bartlett SG, Grossmann AR und Chua N-H (1982) *In vitro* synthesis and uptake of cytoplasmically-synthesized chloroplast proteins. In: M Edelman, RB Hallick und N-H Chua (Eds), *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Vol. **86**, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam/New York/Oxford, pp. 1081-1091

Beffa R, Szell M, Meuwly P, Pay A, Vögeli-Lange R, Metraux JP, Neuhaus G, Meins F und Nagy F (1995) Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J.* **14**, 5753-5761

Bensadoun A und Weinstein D (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, **70**, 241-250

Benting J, Rietveld A, Ansorge I und Simons K (1999) Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association *in vitro*. *FEBS Lett.* **462**, 47-50

Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711-8721

Birnbaumer L (1992) Receptor-to-effector signaling through G-proteins: roles for $\beta\gamma$ -dimers as well as α -subunits. *Cell* **71**, 1069-1072

Birnboim HC und Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1524

Bischoff FB, Molendijk A, Rajendrakumar CSV und Palme K (1999) GTP-binding proteins in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 233-256

- Bolle C** (1995) Analyse der 5'-flankierenden Region von kernkodierten Untereinheiten der plastidären ATP-Synthase aus Spinat (*Spinacia oleracea* L.). Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Briskin DP, Leonard RT und Hodges TK** (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* **148**, 542-568
- Brown DA und London E** (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 1-7
- Chang W-J, Ying Y-S, Rothberg KG, Hooper NM, Turner AJ, Gambliel HA, De Gunzburg J, Mumby SM, Gilman AG und Anderson RGW** (1994) Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell Biol.* **126**, 127-138
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T und Brenner M** (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **104**, 339-347
- Clark GB, Memon AR, Tong C-G, Thompson GA Jr und Roux S J** (1993) Phytochrome regulates GTP-binding protein activity in the envelope of pea nuclei. *Plant J.* **4**, 399-402
- Codina J, Stengel D, Woo SLC und Birnbaumer L** (1986) Beta-subunits of the human liver G_s/G_i signal-transducing proteins and those of bovine retinal rod cell transducin are identical. *FEBS Lett.* **207**, 187-192
- Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG und Sprang SR** (1994) Structures of active conformations of $G_i\alpha 1$ and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**, 1405-1412
- Crespo P, Xu N, Simonds WF und Gutkind JS** (1994) *Ras*-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* **369**, 418-420
- Denker SP, McCaffery JM, Palade GE, Insel PA und Farquhar MG** (1996) Differential distribution of α -subunits and $\beta\gamma$ -subunits of heterotrimeric G-proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J. Cell Biol.* **133**, 1027-1040
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MC und Lefkowitz RJ** (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 653-688
- Drøbak BK, Watkins PAC, Bunney TD, Dove SK, Shaw PJ, White IR und Millner PA** (1995) Association of multiple GTP-binding proteins with the plant cytoskeleton and nuclear matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 7-13
- Elich TE und Chory J** (1997) Phytochrome: if it looks and smells like a histidine kinase, is it a histidine kinase? *Cell* **91**, 713-716

- Fairley-Gremont K und Assmann SM** (1991) Evidence for G-protein regulation of inward potassium ion channel current in guard cells of faba bean. *Plant Cell* **3**, 1037-1044
- Feinberg AP und Vogelstein B** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 2-13
- Flores S und Tobin EM** (1986) Benzyladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba*: apparent post-transcriptional regulation. *Planta* **168**, 340-349
- Fong HK, Amatruda TT III, Birren BW und Simon MI** (1987) Distinct forms of the β -subunit of GTP-binding regulatory proteins identified by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3792-3796
- Fujimoto K** (1995) Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J. Cell Sci.* **108**, 3443-3449
- Fujisawa Y, Kato T, Ohki S, Ishikawa A, Kitano H, Sasaki T, Asahi T und Iwasaki Y** (1999) Suppression of the heterotrimeric G-protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7575-7580
- Galbiati F, Volonte D, Meani D, Milligan G, Lublin DM, Lisanti MP und Parenti M** (1999) The dually acylated NH_2 -terminal domain of $\text{G}_i\alpha$ is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated G-protein α -subunits in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**, 5843-5850
- Gautam N, Downes GB, Yan K und Kisselev O** (1998) The G-protein $\beta\gamma$ -komplex. *Cell. Signal.* **10**, 447-455
- Gelli A, Higgins VJ und Blumwald E** (1997) Activation of plasma membrane Ca^{2+} -permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* **113**, 269-279
- Genty B, Briantais J-M und Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **990**, 87-92
- Gilman AG** (1987) G-proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615
- Gotor C, Lam E, Cejudo FJ und Romero LC** (1996) Isolation and analysis of the soybean *SGA2* gene (cDNA), encoding a new member of the plant G-protein family of signal transducers. *Plant. Mol. Biol.* **32**, 1227-1234
- Håkansson G, van der Mark F, Bonnett HAT und Glimelius K** (1988) Variant mitochondrial protein and DNA patterns associated with cytoplasmic male-sterile lines of *Nicotiana*. *Theor. Appl. Genet.* **76**, 431-437

- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Harder T und Simons K** (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 534-542
- Henriksson D und Eriksson I** (1988) Serine hydroxymethyltransferase from spinach leaf mitochondria. Purification and characterization. *Physiol. Plant.* **74**, 602-606
- Hepler JR und Gilman AG** (1992) G-proteins. *Trends in Biochem. Sci.* **17**, 383-387
- Higgins JB und Casey PJ** (1994) *In vitro* processing of recombinant G-protein γ -subunits. *J. Biol. Chem.* **269**, 9067-9073
- Higgins JB und Casey PJ** (1996) The role of prenylation in G-protein assembly and function. *Cell. Signal.* **8**, 433-437
- Hodges TK und Mills D** (1986) Isolation of the plasma membrane. *Methods Enzymol.* **118**, 41-54
- Hooley R** (1998) Plant hormone perception and action: a role for G-protein signal transduction? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **353**, 1425-1430
- Horsch R, Frey F, Hofmann N, Eichholtz D, Rogers S und Fraley R** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231
- Huang C, Hepler JR, Chen LT, Gilman AG, Anderson RGW und Mumby SM** (1997) Organization of G-proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2365-2378
- Iwabuchi K, Handa K und Hakomori S** (1998) Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 33766-33773
- Iwasaki Y, Kato T, Kaidoh T, Ishikawa A und Asahi T** (1997) Characterization of the putative α -subunit of a heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Mol. Biol.* **34**, 563-572
- Jahangeer S und Rodbell M** (1993) The disaggregation theory of signal transduction revisited: further evidence that G-proteins are multimeric and disaggregate to monomers when activated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8782-8786
- Jones HD, Smith SJ, Desikan R, Plakidou-Dymock S, Lovegrove A und Hooley R** (1998) Heterotrimeric G-proteins are implicated in gibberelin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone. *Plant Cell* **10**, 245-253
- Josefsson L-G und Rask L** (1997) Cloning of a putative G-protein-coupled receptor from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **249**, 415-420
- Kaufman L S** (1993) Transduction of blue-light signals. *Plant Physiol.* **102**, 333-337

- Kaydamov C, Tewes A, Adler K und Manteuffel R** (2000) Molecular characterization of cDNAs encoding G-protein α - and β -subunits and study of their temporal and spatial expression patterns in *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. Biochim. Biophys. Acta **1491**, 143-160
- Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, Adam E, Harter K, Schäfer E und Nagy F** (1999) Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. Plant Cell **11**, 1445-1456
- Kleiner O, Kircher S, Harter K und Batschauer A** (1999) Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. Plant J. **19**, 289-296
- Koop H-U, Steinmüller K, Wagner H, Rössler C, Eibl C und Sacher L** (1996) Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. Planta **199**, 193-201
- Krause GH und Weis E** (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**, 313-349
- Kubler E, Dohlman HG und Lisanti MP** (1996) Identification of Triton X-100 insoluble membrane domains in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G protein subunits. J. Biol. Chem. **271**, 32975-32980
- Kurzchalia T und Parton RG** (1999) Membrane microdomains and caveolae. Curr. Opin. Cell Biol. **11**, 424-231
- Kusnetsov VV, Oelmüller R, Sarwat MI, Porfirova SA, Cherepneva GN, Herrmann RG und Kulaeva ON** (1994) Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels. Planta **194**, 318-327
- Kusnetsov VV und Oelmüller R** (1996) Isolation and characterization of cDNAs encoding the subunit beta of heterotrimeric G-proteins from *N. tabacum* (Accession No. X98161). Plant Physiol. **111**, 948
- Kyte J und Doolittle RF** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. **157**, 105-132
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685
- Lambright DG, Sondek J, Böhm A, Skiba NP, Hamm HE und Sigler PB** (1996) The 2,0 Å crystal structure of a heterotrimeric G-protein. Nature **379**, 311-319
- Landsberger M** (1999) Studien zur Regulation des kernkodierten *AtpC*-Gens aus Spinat (*Spinacia oleracea* L.). Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Larsson C, Widell S und Kjellbom P** (1987) Preparation of high-purity plasma membranes. Methods Enzymol. **148**, 558-568

- Levine MA, Smallwood PM, Moen PT jr, Helman LJ und Ahn TG** (1990) Molecular cloning of β_3 -subunit, a third form of the G-protein β -subunit polypeptide Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 2329-2333
- Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova J-E, Hansen S H, Nishimoto I und Lisanti MP** (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G-proteins and caveolin. J. Biol. Chem. **270**, 15693-15701
- Li W und Assmann S** (1993) Characterization of a G-protein-regulated outward K^+ current in mesophyll cells of *Vicia faba* L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 262-266
- Lin C, Ahmad M und Cashmore AR** (1996) *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. Plant J. **10**, 893-902
- Lisanti MP und Rodrigues-Boulan E** (1990) Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. Trends Biochem. Sci. **15**, 113-118
- Lisanti MP, Sargiacomo M, Graeve L, Saltiel AR und Rodriguez-Boulan E** (1988) Polarized apical distribution of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 9557-9561
- Lisanti MP, Tang ZL, Scherer PE und Sargiacomo M** (1995) Caveolae purification and glycosylphosphatidylinositol-linked protein sorting in polarized epithelia. Methods Enzymol. **250**, 655-668
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ und Clapham DE** (1987) The $\beta\gamma$ -subunit of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. Nature **325**, 321
- Low PS und Chandra S** (1994) Endocytosis in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **45**, 609-631.
- Maier O, Ehmsen E und Westermann P** (1995) Trimeric G-protein α -subunits of the G_s and G_i families localized at the Golgi membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. **208**, 135-143
- Matsuda T, Hashimoto Y, Ueda H, Asano T, Matsuura Y, Doi T, Takao T, Shimonishi Y und Fukuda Y** (1998) Specific isoprenyl group linked to transducin γ -subunit is a determinant of its unique signaling properties among G-proteins. Biochemistry **37**, 9843-9850
- McNellis TW und Deng X-W** (1995) Light control of seedling morphogenetic pattern. Plant Cell **7**, 1749-1761
- Medynski DC, Sullivan K, Smith D, Van Dop C, Chang FH, Fung BK, Seeburg PH und Bourne HR** (1985) Amino acid sequence of the α -subunit of transducin deduced from the cDNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 4311-4315

- Morita N, Nakazato H, Okuyama H, Kim Y und Thompson GA Jr** (1996) Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochim. Biophys. Acta* **1290**, 53-62
- Moss J und Vaughan M** (1988) ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **61**, 303-379
- Nakamura S-I und Rodbell M** (1990) Octyl glucoside extracts GTP-binding regulatory proteins from rat brain "synaptoneurosomes" as large, polydisperse structures devoid of $\beta\gamma$ -complexes and sensitive to disaggregation by guanine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6413-6417
- Nakamura S-I und Rodbell M** (1991) Glucagon induces disaggregation of polymer-like structures of the α -subunit of the stimulatory G-protein in liver membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7150-7154
- Neer EJ** (1994) G-proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* **3**, 3-14
- Neer EJ** (1995) Heterotrimeric G-proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R und Smith TF** (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300
- Neubig RR** (1994) Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.* **8**, 939-946
- Neuhaus G, Bowler C, Kern R und Chua N-H** (1993) Calcium/calmodulin-dependent and independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* **73**, 937-952
- Noel JP, Hamm HE und Sigler PB** (1993) The 2,2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* **366**, 654-663
- Nukada T, Tanabe T, Takahashi H, Noda M, Haga K, Haga T, Ichiyama A, Kangawa K, Hiranaga M, Matsuo H und Numa S** (1986) Primary structure of the α -subunit of bovine adenylate cyclase-inhibiting G-protein deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* **197**, 305-310
- Nukada T, Tanabe T, Takahashi H, Noda M, Hirose T, Inayama S und Numa S** (1986) Primary structure of the α -subunit of bovine adenylate cyclase-stimulating G-protein deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* **195**, 220-224
- Obrdlik P, Neuhaus G und Merkle T** (2000) Plant heterotrimeric G-protein β -subunit is associated with membranes *via* protein interactions involving coiled-coil formation. *FEBS Lett.* **476**, 208-212
- Oelmüller R** (1989) Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels. *Photochem. Photobiol.* **49**, 229-239

- Oxley D und Bacic A** (1999) Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 14246-14251
- Palmgren MG, Askerlund P, Fredrikson K, Widell S, Sommarin M und Larsson C** (1990) Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. Plant Physiol. **92**, 871-880
- Palomares R, Herrmann RG und Oelmüller R** (1993) Post-transcriptional and post-translational regulatory steps are crucial in controlling the appearance and stability of thylakoid polypeptides during the transition of etiolated tobacco seedlings to white light. Eur. J. Biochem. **217**, 345-352
- Parton RG und Simons K** (1995) Digging into caveolae. Science, **269**, 1398-1399
- Parton RG** (1996) Caveolae and caveolins. Curr. Opin. Cell Biol. **8**, 542-548
- Pennington SR** (1994) GTP-binding proteins: Heterotrimeric G-proteins. Protein Profile 1 (3), Academic Press.
- Pingret JL, Journet EP und Barker DG** (1998) *Rhizobium* nod factor signaling. Evidence for a G-protein-mediated transduction mechanism. Plant Cell **10**, 659-672
- Plakidou-Dymock S, Dymock D und Hooley R** (1998) A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. Curr. Biol. **8**, 315-324
- Pralle A, Keller P, Florin E-L, Simons K und Hörber JKH** (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. J. Cell Biol. **148**, 997-1007
- Pronin AN und Gautam N** (1992) Interaction between G-protein β and γ -subunit types is selective. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 6220-6224
- Pronin AN und Gautam N** (1993) Proper processing of a G-protein γ -subunit depends on complex formation with a β -subunit. FEBS Lett. **328**, 89-93
- Randall SK, Marshall MS und Crowell DN** (1993) Protein isoprenylation in suspension-cultured tobacco cells. Plant Cell **5**, 433-442
- Raposo G, Dunia I, Marullo S, Andre C, Guillet JG, Strosberg AD, Benedetti EL und Hoebeke J** (1987) Redistribution of muscarinic acetylcholine receptors on human fibroblasts induced by regulatory ligands. Biol. Cell **60**, 117-123
- Rehm A und Ploegh HL** (1997) Assembly and intracellular targeting of the $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G-proteins. FEBS Lett. **416**, 39-44
- Romero L und Lam E** (1993) Guanine nucleotide binding protein involvement in early steps of phytochrome-regulated gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 1465-1469

- Saalbach G, Natura G, Lein W, Buschmann P, Dahse I, Rohrbeck M und Nagy F** (1999) The α -subunit of a heterotrimeric G-protein from tobacco, NtGP α 1, functions in K⁺ channel regulation in mesophyll cells. *J. Exp. Bot.* **50**, 53-61
- Sakamoto K und Nagatani A** (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J.* **10**, 859-868
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Schägger H und von Jagow G** (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231
- Schägger H, Cramer WA und von Jagow G** (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230
- Schlegel A, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Mehta P, Zhang X-L, Scherer PE und Lisanti MP** (1998) Crowded little caves: structure and function of caveolae. *Cell. Signal.* **10**, 457-463
- Schmidt CJ, Thomas TC, Levine MA und Neer EJ** (1992) Specificity of G-protein β - and γ -subunit interactions. *J. Biol. Chem.* **267**, 13807-13810
- Schnitzer JE, McIntosh DP, Dvorak AM, Liu J und Oh P** (1995) Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* **269**, 1435-1439
- Schopfer P** (1989) Experimentelle Pflanzenphysiologie: Einführung in die Anwendungen. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York
- Schreiber U** (1986) Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.* **9**, 261-272.
- Schürmann A, Rosenthal W, Schultz G und Joost HG** (1992) Characterization of GTP-binding proteins in Golgi-associated membrane vesicles from rat adipocytes. *Biochem J.* **283**, 795-801.
- Shaul PW und Anderson RGW** (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol.* **275**, L843-L851
- Sherrier DJ, Prime TA und Dupree P** (1999) Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from *Arabidopsis*. *Electrophoresis* **20**, 2027-2035
- Simon MI, Strathmann MP und Gautam N** (1991) Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808

- Simons K und Ikonen E** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572
- Smart EJ, Ying Y-S, Mineo C und Anderson RGW** (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10104-10108
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE und Sigler PB** (1996) Crystal structure of a G_A protein $\beta\gamma$ dimer at 2,1 Å resolution. *Nature* **379**, 369-374
- Sopory SK, Sanan N und Oelmüller R** (1999) Light signal transduction and gene expression. In: GS Singhal, G Renger, SK Sopory, K-D Irrgang und Govindjee (Eds), *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*, Narosa Publishing House, New Delhi, India, pp. 897-929
- Spring DJ und Neer EJ** (1994) A 14-amino acid region of the G-protein γ -subunit is sufficient to confer selectivity of γ binding to the β -subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, 22882-22886
- Studier FW und Moffat BA** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Susek RE, Ausubel FM und Chory J** (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear *CAB* and *RBSC* gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**, 787-799
- Takei Y, Takahashi K, Kanaho Y und Katada T** (1994) Possible involvement of a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in protein transport into nuclei isolated from rat liver. *J. Biochem.* **115**, 578-583
- Takos AM, Dry IB und Soole KL** (1997) Detection of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins on the surface of *Nicotiana tabacum* protoplasts. *FEBS Lett.* **405**, 1-4
- Tittgen J, Hermans J, Steppuhn J, Janson Th, Jansson Ch, Andersson B, Nechushtai R, Nelson N und Herrmann RG** (1986) Isolation of cDNA clones for fourteen nuclear-encoded thylakoid proteins. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 258-265
- Troidl E-M** (1995) Untersuchungen zur kompartmentfremden Transformation und zur Struktur-/Funktionsbeziehungen plastidärer Proteine bei *Oenothera* und Tabak. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- van der Voorn L und Ploegh HL** (1992) The WD-40 repeat. *FEBS Lett.* **307**, 131-134
- Varma R und Mayor S** (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798-801
- von Arnim A und Deng X-W** (1996) Light control of seedling development. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 215-243
- von Weizsaecker E, Strathmann MP und Simon MI** (1992) Diversity among the β -subunits of heterotrimeric GTP-binding proteins: characterization of a novel β -subunit cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 350-356

- Warpeha KMF, Hamm HE, Rasenick MM und Kaufman LS** (1991) A blue light activated GTP-binding protein in the plasma membrane of etiolated pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8925-8929
- Watson AJ, Katz A und Simon MI** (1994) A fifth member of the mammalian G-protein β -subunit family. Expression in brain and activation of the $\beta 2$ isotype of phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **269**, 22150-22156
- Wedegaertner PB, Wilson PT und Bourne HR** (1995) Lipid modifications of trimeric G-proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 503-506
- Weiss CA, Garnaat CW, Mukai K, Hu Y und Ma H** (1994) Isolation of cDNAs encoding guanine nucleotide-binding protein β -subunit homologues from maize (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9554-9558
- Weiss CA, Huang H und Ma H** (1993) Immunolocalization of the G-protein α -subunit encoded by the *GPA1* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 1513-1528
- Weiss CA, White E, Huang H und Ma H** (1997) The G-protein α subunit (Gp $\alpha 1$) is associated with the ER and the plasma membrane in meristematic cells of *Arabidopsis* and cauliflower. *FEBS Lett.* **407**, 361-367
- Westermann M, Leutbecher H und Meyer HW** (1999) Membrane structure of caveolae and isolated caveolin-rich vesicles. *Histochem. Cell Biol.* **111**, 71-81
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W und Crowther RA** (1988) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4884-4888
- Yan K, Kalyanaraman V und Gautam N** (1996) Differential ability to form the G-protein $\beta\gamma$ -complex among members of the β - and γ -subunit families. *J. Biol. Chem.* **271**, 7141-7146
- Yang Z** (1996) Signal transducing proteins in plants: an overview. In: DPS Verma (Ed), *Signal transduction in plant growth and development*, Springer Verlag, Wien/New York, pp. 1-37
- Yasuda H, Lindorfer MA, Woodfork KA, Fletcher JE und Garrison JC** (1996) Role of the prenyl group on the G-protein α -subunit in coupling trimeric G-proteins to A1 adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 18588-18595

Publikationsliste

***Peškan T, Westermann M und Oelmüller R** (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. Eur. J. Biochem. (im Druck)

***Oelmüller R, Peškan T, Westermann M, Sherameti I, Chandok M, Sopory SK, Wöstemeyer A, Kusnetsov V, Bezhani S und Pfannschmidt T** (2000) Novel aspects in photosynthesis gene regulation. In: SK Sopory und R Oelmüller (Eds.), Signal transduction in plants, Kluwer Academic Press, New York (im Druck)

***Peškan T und Oelmüller R** (2000) Heterotrimeric G-protein β -subunit is localized in the plasma membrane and nuclei of tobacco leaves. Plant Mol. Biol. **42**, 915-922

Peškan T, Pedreño MA, Krsnik-Rasol M und Muñoz R (1997) Subcellular localization and polymorphism of peroxidase in horse-radish tumour and teratoma tissue. Biol. Plant. **39**, 575-582

Peškan T, Curkovic -Perica M und Krsnik-Rasol M (1996) Biochemical characterization of horse-radish tumour and teratoma tissues. Plant Physiol. Biochem. **34**, 385-391

Muraja J, Peškan T, Lorkovic Z und Krsnik-Rasol M (1994) Ultrastructure and protein pattern of horse-radish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) crown-gall tissue. Acta Bot. Croat. **53**, 1-6

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie am Institut für Allgemeine Botanik der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Oelmüller, bei dem ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Unterstützung und für seine Diskussionsbereitschaft bedanke.

Sehr herzlich danke ich Prof. Dr. Marijana Krsnik-Rasol, Dr. Zdravko Lorkovic, Dr. Hrvoje Fulgosi und Prof. Dr. Iwona Adamska, die meine ersten Schritte in die Wissenschaft erleichtert haben.

Herrn Dr. Martin Westermann danke ich für seine Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Für die Antikörper danke ich Prof. Dr. R. B. Klösgen, Prof. Dr. E. Glaser und Dr. W. Filipowicz.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen in München und Jena möchte ich mich für die Unterstützung bei meiner Doktorarbeit und für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Im Besonderen danke ich Jürgen für seine Hilfe bei der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit und für die Unterstützung und Motivation während meiner Promotionszeit, sowie meinen Eltern, die zu jeder Zeit mein Rückhalt waren.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Peškan
Vorname:	Tatjana
Geburtsdatum:	27. 03. 1969
Geburtsort:	Varazdin, Kroatien
Staatsangehörigkeit:	Kroatisch

Schulbildung

1976 – 1984	Grundschule in Varazdin
1984 – 1988	weiterführende Schule Abschluß: Abitur

Universität

1988 – 1993	Studium der Biologie an der Fakultät für Naturwissenschaften und Mathematik, Universität Zagreb, Kroatien
April, 1993	Abschluß als Diplom – Biologe, Hauptfach Molekularbiologie
Sept. 1993 – Jan. 1996	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Molekularbiologie der Fakultät für Naturwissenschaften und Mathematik, Universität Zagreb
Jan. 1996 – Dez. 1998	Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Molekulare Mechanismen der Entwicklung“, Ludwig-Maximilians-Universität, München
Seit Jan. 1999	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

ERKLÄRUNG

über die Selbständigkeit

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, 9. 10. 2000

Tatjana Peškan